Differentielle Regulation der Tn10 codierten Tetrazyklinresistenzgene: Repressor-Operator Wechselwirkung und die Funktion der Operatoren O_1 und O_2 bei der Transkriptionskontrolle

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch - Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Iris Meier

aus Offenbach

Düsseldorf

1987

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Differentielle Regulation der Tn10 codierten Tetrazyklinresistenzgene: Repressor-Operator Wechselwirkung und die Funktion der Operatoren O_1 und O_2 bei der Transkriptionskontrolle

Inaugural - Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Iris Meier
aus Offenbach

Düsseldorf
1987

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Hillen
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. C.P. Hollenberg
Tag der Einreichung:	31. Juli 1987
Tag der mündlichen Prüfung:	13. November 1987

Meiner Mutter und meinem Vater

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Hillen, unter dessen Leitung diese Arbeit angefertigt wurde, für die vielen anregenden und fördernden Diskussionen und seinen fachlichen Rat.
Allen Mitglieder des Arbeitskreises danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und für das gute Arbeitsklima.
Insbesondere möchte ich Herrn Dr. Lewis Wray herzlich für die Hilfsbereitschaft bei der gerichteten Mutagenese danken.
Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. Riesner für die Möglichkeit, meine Arbeit im Institut für Physikalische Biologie der Universität Düsseldorf fertigzustellen.
In den Dank schließe ich alle Mitglieder des Arbeitskreises von Prof. Dr. D. Riesner ein, die durch ihre Hilfsbereitschaft die Arbeit erleichterten und mich durch ihre Diskussionsbereitschaft unterstützten.
Herrn Prof. Dr. H.G. Gassen, Darmstadt, danke ich für die Möglichkeit, Oligonukleotidsynthesen in seinem Arbeitskreis durchzuführen.
Herrn Dr. Klaus Schneider und Herrn Prof. Dr. Ch.F. Beck, Freiburg, danke ich für die Überlassung des Plasmids pCB302a.
Dem Fonds der Chemischen Industrie danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit durch ein Promotionsstipendium.
Frau H. Gruber möchte ich für die Reinschrift der Arbeit danken.

R. Hell danke ich für sein Verständnis und seine Anteilnahme, die mich während der Dauer der Arbeit begleitet haben.

Die vorliegende Dissertation wurde am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Hochschule Darmstadt und am Institut für Physikalische Biologie der Universität Düsseldorf in der Zeit von März 1984 bis Juli 1987 angefertigt.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543909_0037

INHALTSVERZEICHNIS

	Abkürzungsverzeichnis	
1	**Zusammenfassung**	1
2	**Einleitung**	2
3	**Materialien und Methoden**	12
3.1	Materialien	12
3.2	Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen	13
3.3	E.coli Stämme, Phagen und Plasmide	16
3.4	Detektion von ß-Galaktosidaseaktivität auf Platten	20
3.5	Transformation von E.coli Stämmen	20
3.5.1	Herstellung von kompetenten Zellen	20
3.5.2	Transformation der kompetenten Zellen	20
3.6	Schnellpräparation von Plasmiden	21
3.6.1	Schnellpräparation von Plasmiden aus einem Bakterienrasen	21
3.6.2	Schnellpräparation von Plasmiden aus Flüssigkulturen	21
3.7	Plasmidpräparation	22
3.8	Klonierung mit dem E.coli Phagen M13	23
3.8.1	Anzucht von M13-Phagen	23
3.8.2	Präparation von einzelsträngiger M13-DNA	24
3.8.3	Präparation von doppelsträngiger M13-DNA	24
3.8.4	Transformation von E.coli mit M13 RF-DNA	25
3.8.5	Minipräparation von M13 RF-DNA	25
3.9	Arbeiten mit dem E.coli-Phagen λ	26
3.9.1	Anzucht von λ-Phagen	27
3.9.2	Induktion von lysogenen λ -Phagen	27
3.9.3	Minipräparation von λ -DNA	28
3.9.4	Homologe Rekombination	29

3.9.4.1	Rekombination zwischen M13-Derivaten und λ-Phagen	29
3.9.4.2	Rekombinatin zwischen Plasmiden und λ-Phagen	30
3.9.5	Konstruktion von λ-lysogenen Stämmen	30
3.10	Aktivitätsbestimmung von Enzymen	31
3.10.1	Bestimmung der ß-Galaktosidase-Aktivität	31
3.10.2	Bestimmung der Galaktokinase-Aktivität	32
3.11	Fällung von Nukleinsäuren	34
3.11.1	Fällung mit Polyethylenglykol	34
3.11.2	Fällung mit Ethanol	35
3.12	Reaktionen mit DNA-modifizierenden Enzymen	35
3.12.1	Restriktionsverdauungen von DNA	35
3.12.2	Ligation von DNA-Fragmenten	35
3.12.3	Auffüllen von einzelsträngigen 5' Enden der DNA	36
3.12.4	Dephosphorylierung von 5' Enden der DNA	36
3.12.5	Phosphorylierung von einzelsträngigen 5' Enden der DNA	37
3.13	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	37
3.13.1	Agarosegel-Elektrophorese	38
3.13.2	Polyacrylamidgel-Elektrophorese	38
3.13.2.1	Native Polyacrylamidgel-Elektrophorese	38
3.13.2.2	Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese	39
3.14	Detektion von Nukleinsäuren in Elektrophoresegelen	40
3.14.1	Anfärben mit Ethidiumbromid	40
3.14.2	Anfärben mit Silber	40
3.14.3	Detektion durch Fluoreszenz-Schattierung	41
3.14.4	Autoradiographie	41
3.15	Elution von Nukleinsäuren aus Elektrophoresegelen	42
3.15.1	Elution aus Polyacrylamidgelen	42
3.15.2	Elution aus Agarosegelen	43
3.16	Sequenzierung von DNA	44
3.17	DNaseI-Schutzexperimente	46
3.17.1	Vorbereitung der DNA	46
3.17.2	DNaseI-Reaktion	46
3.17.3	Purinspezifische Spaltung nach Maxam und Gilbert	47

3.18	Sequenziergele	48
3.19	Bindung von Protein-DNA-Komplexen an Nitrozellulose-Filter	50
3.20	Messung der Dissoziationsgeschwindigkeit von Protein-DNA-Komplexen	50
3.21	Synthese von Oligonukleotiden	51
3.22	Aufreinigung der synthetisierten Oligonukleotide	53
3.22.1	Aufreinigung durch HPLC	53
3.22.2	Aufreinigung durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese	54
3.23	Hybridisierung von Oligonukleotiden	55
3.24	Gerichtete Mutagenese	55
3.25	G 50-Säulenchromatographie	57
3.26	DE52-Säulenchromatographie	58
3.27	CsCl-Dichtegradientenzentrifugation	58
3.28	Radioaktivitätsmessung	59
3.29	Absorptionsmessung	59
3.30	Silikonisieren von Kunststoffgefäßen und Glaswolle	59
3.31	Aufbereitung von Dialyseschläuchen	60
4	**Ergebnisse**	61
4.1	**Der Einfluß der Nukleotidsequenz der tet-Operatoren auf die Bindung des Tn10 Tet-Repressors**	61
4.1.1	Synthese der Oligonukleotide	65
4.1.2	Klonierung der synthetischen Operatoren in M13 mp11	66
4.1.3	Insertion der tet-Operatorfragmente in pUR250	68
4.1.4	DNaseI-Schutzexperimente	71
4.1.5	Die Repressor-Operator Bindung in vivo	74
4.1.5.1	Insertion der tet-Operatorfragmente in pRT291	75
4.1.5.2	Messung der Repressor-Operator Affinitäten	79
4.1.6	Dissoziationskinetiken der Repressor-Operator Komplexe	81

4.2	**Der Einfluß des Abstands der beiden Operatorhälften auf die Bindung des Tn10 Tet-Repressors**	84
4.2.1	Synthese der Oligonukleotide	84
4.2.2	Klonierung der synthetischen Operatoren in M13 mp10	85
4.2.3	Insertion der tet-Operatorfragmente in pRT291	86
4.2.4	Bindung des Tet-Repressors an die Operator-Abstands-Mutanten	88
4.3	**Die Funktion der Operatoren O_1 und O_2 bei der Regulation der Gene tetA und tetR**	91
4.3.1	Gerichtete Mutagenese der Tn10-tet-Regulatorregion	92
4.3.2	Bindung des Tet-Repressors an die mutierten Regulator-regionen: DNaseI-Schutzexperimente	96
4.3.3	Konstrukion von chromosomalen tet-lacZ-Translations-fusionen	101
4.3.3.1	Konstruktion der tet-lacZ-Translationsfusionen in mWH6	102
4.3.3.2	Rekombination der tet-lacZ-Fusionen auf λ plac5 · T743	105
4.3.3.3	Expression und Regulation der tet-lacZ Translations-fusionen	108
4.3.4	Konstruktion von chromosomalen tet-lacZ Transkriptions-fusionen	111
4.3.4.1	Konstruktion der Transkriptionsfusionen in pWH407	112
4.3.4.2	Rekombination der tetA-lacZ Transkriptionsfusionen auf λ RZ11	115
4.3.4.3	Expression und Regulation der tetA-lacZ Transkriptions-fusionen	116
4.3.5	Simultane Expression von tetA und tetR	118
4.3.5.1	Konstruktion von bidirektionalen Transkriptionsfusionen in pCB302a	119
4.3.5.2	Expression und Regulation der tetA-lacZ und tetR-galK Fusionen	122
5	**Diskussion**	125
6	**Literatur**	137
7	**Anhang 1**	148

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption bei der Wellenlänge
Ac_2O	Essigsäureanhydrid
APS	Ammoniumperoxidisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
b	Base
Bisacrylamid	N,N,N',N'-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaar
Brij	Polyethylenglycolmonolaurylether
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	Zählimpuls pro Minute
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DNase	Desoxiribonuklease
dNTP	Desoxiribonukleosid-5'-triphosphat
Doc	Desoxycholsäure
DTE	Dithioerythrol
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
HPLC	Hochdruckfüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl-ß-D-thiogalaktopyranosid
IR	Infrarotlicht
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
NaOAc	Natriumacetat
NTP	Nukleosidtriphosphat
PEG	Polyethylenglycol
POPOP	1,4-Bis-(5-Phenyloxazol-2-yl)-Benzen
PPO	2,5-Diphenyloxacol
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute

UNIV. LEIDEN BIBL.

SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEAA	Triethylammoniumacetat
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
U	Einheit der Enzymaktivität
UV	Ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-cloro-3-indolyl-ß-D-galaktopyranosid

1 ZUSAMMENFASSUNG

Der Tn10 Tet-Repressor reguliert durch Bindung an die Operatoren O_1 und O_2 die divergente Transkription seines eigenen Gens tetR und des Gens tetA für das Tetrazyklin-Resistenzprotein.

Die Messung der Dissoziationskonstanten der isolierten Repressor-O_1 und Repressor-O_2 Komplexe und die Titration von Tet-Repressor durch die beiden Operatoren in vivo zeigen eine zweifach höhere Affinität des Repressors zu O_2. Durch Punktmutation des bei O_1 und O_2 differierenden Basenpaars an Position 7 wurde gezeigt, daß dieses an der Bindung des Repressors beteiligt ist. Die Affinitätsunterschiede des Repressors zu den verschiedenen Operatorsequenzen führen nicht zu Strukturunterschieden der Komplexe, die durch DNaseI-Schutzexperimente detektierbar sind.

Der Abstand zwischen den beiden Hälften von O_1 wurde um ± 1 Basenpaar variiert. Die dadurch bewirkte drastische Reduktion der Repressorbindung zeigt, daß diese stark von der Anordnung der beiden Operatorhälften zueinander abhängt.

Jeweils einer der beiden Operatoren wurde innerhalb der tet-Kontrollregion durch gerichtete Mutagenese inaktiviert. DNaseI-Schutzexperimente zeigen, daß die Mutationen zu einer selektiven Besetzung der verbleibenden Wildtyp-Operatoren mit Repressor führen. Die mutierten Operatoren werden mit einer etwa 1000fach reduzierten Bindekonstante ebenfalls besetzt. Die Nachbarschaft eines WT-Operator-Repressor Komplexes hat dabei keinen kooperativen Einfluß auf die Bindung an die Mutanten.

Die Regulation der Transkription von tetA und tetR durch die singulären Repressor-Operator Komplexe wurde durch Fusion der tet-Kontrollregion an lacZ und galK als Indikatorgene untersucht. O_1 reguliert sowohl die Expression von tetA als auch von tetR. O_2 reprimiert dagegen nur tetA und erlaubt die Transkription von tetR. Dadurch wird eine differentielle Regulation der Expression der beiden Gene ermöglicht.

2 EINLEITUNG

Sowohl die verschiedenen Zellen eines höheren Organismus als auch die verschiedenen Stadien, die eine einzelne Zelle im Laufe ihrer Entwicklung durchläuft, unterscheiden sich in ihrer Morphologie, ihrer Funktion und den spezifischen biochemischen Prozessen, die in ihnen ablaufen. Der Unterschied zwischen den einzelnen Zelltypen und Entwicklungsstadien kommt durch einen unterschiedlichen Satz an Proteinen zustande, die, als Enzyme, Struktur- oder Regulatorproteine, die charakteristischen Eigenschaften der Zelle bestimmen. Obwohl alle Zellen eines Organismus prinzipiell die gleiche genetische Information besitzen, werden die auf der DNA codierten Proteine nicht alle gleichzeitig und in gleichem Umfang gebildet. Die Synthese der zellulären Proteine muß vielmehr einer exakten Regulation unterliegen.

Diese Regulation kann auf den verschiedenen Stufen der Expression der genetischen Information zum Protein erfolgen, so bei der Transkription des betreffenden Gens, bei der Prozessierung der gebildeten mRNA oder bei der Translation der mRNA an den Ribosomen (Alberts et al., 1983). Die erste Entscheidungsmöglichkeit besteht bei der Transkription. Für diese Entscheidung bedarf es eines Mechanismus, der die Übertragung eines bestimmten Signals auf die Transkriptionsreaktion ermöglicht.

Das Signal kann dabei sehr verschiedenartig sein, wie z.B. der Einfluß eines Substrates auf die Bildung der substratverwertenden Enzyme (Lewin, 1974), die Induktion der Synthese schwermetallbindender Proteine durch Schwermetalle (Yagle und Palmiter, 1985), der Einfluß von Licht auf die Expression photosyntheseassoziierter Gene bei Pflanzen (Kreuzaler et al., 1983), oder die Wirkung eines Steroidhormons auf die Differenzierung tierischer Zellen (Yamamoto, 1985). In jedem Fall muß am Ende einer unterschiedlich langen Reaktionskette eine Wechselwirkung mit der DNA stehen.

Bei Prokaryonten wurden bereits einige Beispiele für die Regulation der Transkription gut charakterisiert (McClure, 1985). Als Überträger eines Signals dienen hier Proteine, die an die DNA binden (Gilbert und

Müller-Hill, 1966; Squires et al., 1975; Miller und Reznikoff, 1978). Dabei sind zwei Eigenschaften der Proteine entscheidend für ihre Funktion: Zum einen müssen sie eine oder wenige bestimmte Stellen auf der DNA spezifisch erkennen und nur an diesen Stellen binden und zum anderen muß ihre Affinität zu diesen Bindestellen modulierbar sein.

Auch für einige eukaryontische Gene wurden regulatorische Proteine identifiziert, die durch ihre Bindung an die DNA die Transkription aktivieren oder reprimieren (Yamamoto, 1985; Struhl, 1987). Die Regulation der Genexpression durch DNA-Bindeproteine scheint also ein allgemeines Prinzip sowohl bei Pro- als auch bei Eukaryonten zu sein.

Das Prinzip einer solchen Regulation bei Prokaryonten soll im folgenden am Beispiel des gut charakterisierten lac-Operons aus E.coli dargestellt werden (Abb. 2.1). Die Gene lacZ, lacY und lacA, die für die Proteine ß-Galaktosidase, Permease und Transacetylase codieren, werden als polycistronische mRNA transkribiert. Die Transkription erfolgt nur in Anwesenheit von Lactose, zu deren Verwertung die Genprodukte dienen. In Abwesenheit von Lactose bleiben die Gene abgeschaltet. Diese Regulation erfolgt durch ein Protein, den Lac-Repressor (Gilbert und Müller-Hill, 1966).

Der Lac-Repressor besitzt eine spezifische Bindestelle auf der DNA, den lac-Operator (Gilbert und Müller-Hill, 1967). Der lac-Operator, eine palindromische DNA-Sequenz von 35 bp, überlappt mit der Startstelle der Transkription, dem Promotor (Gilbert und Maxam, 1973). Die Bindung des Lac-Repressors an den Operator maskiert Teile des Promotors und verhindert dadurch, daß die RNA-Polymerase binden und die lac-Gene transkribieren kann (oberer Teil von Abb. 2.1). In diesem Zustand befindet sich das Operon in Abwesenheit von Lactose. Wird Lactose von der Zelle aufgenommen, entsteht daraus z.T. Allolactose, die als Induktor an den Lac-Repressor bindet. Dadurch verliert das Protein seine Affinität zum Operator, der Promotor wird frei und die Gene können transkribiert werden (unterer Teil von Abb. 2.1) (Miller und Reznikoff, 1978). Im Fall des lac-Operons blockiert also die Bindung eines Proteins die Transkription und das Signalmolekül, der Induktor, schaltet die betreffenden Gene an, indem es die Bindung des Proteins an die DNA verhindert.

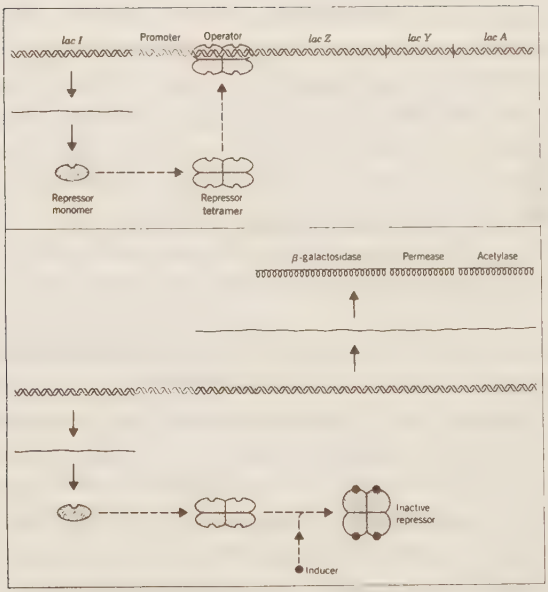


Abb. 2.1: Regulation der Expression des lac-Operons von E.coli. Die DNA ist als Doppelhelix dargestellt, die mRNA als einfache Linie. Das Lac-Repressor-Monomer ist als Oval dargestellt. Die Konformationsänderung durch die Bindung des Induktors wird durch die Umwandlung der Ovale in Kreise symbolisiert. Im oberen Teil der Abbildung bindet der Repressor als Tetramer an den Operator und verhindert damit die Transkripion der Gene lacZ, lacY und lacA. Im unteren Teil der Abbildung wird der Repressor durch die Bindung des Induktors Allolactose, dargestellt durch die ausgefüllten Kreise, inaktiviert. Die drei Gene werden vom Promotor aus transkribiert und die Proteine, dargestellt durch Spiralen, werden synthetisiert. Die Abbildung wurde Lewin (1985) entnommen.

Es gibt andere Beispiele, bei denen die Bindung des Signalmoleküls die Affinität des Repressors zur DNA erhöht, so daß es nur in Anwesenheit des Signals zu einer Repression kommt. Dies ist z.B. beim trp-Operon der Fall, dessen Gene für die Enzyme der Tryptophan-Biosynthese codieren und das in Anwesenheit von Tryptophan abgeschaltet bleibt (Rose und Yanofsky, 1974). In beiden Fällen handelt es sich dabei um eine negative Regulation, da die Bindung des Proteins an die DNA die

Expression der betreffenden Gene blockiert.

Unter positiver Regulation versteht man dagegen, daß ein Gen nur dann effizient transkribiert wird, wenn ein Protein an eine spezifische Stelle bindet und damit die Bindung der DNA-Polymerase begünstigt (McClure, 1985). Auch hierfür sind Beispiele bei Prokaryonten bekannt, wie die Bindung des CAP-Proteins bei der Regulation von Genen, die der Katabolit-Repression unterliegen (de Crombrugghe et al., 1984).

In allen bisher beschriebenen Fällen führte die Bindung eines einzelnen Proteins an eine spezifische Bindestelle auf der DNA zu der Entscheidung, ob ein Gen exprimiert wird oder nicht. Bereits bei Prokaryonten ist jedoch auch ein Beispiel für eine komplexere Regulation bekannt, bei der die Wechselwirkung von zwei Proteinen mit wenigen verschiedenen Bindestellen die Aktivierung bzw. Repression ganzer Gruppen von Genen reguliert.

Dies ist bei dem temperenten E.coli Phagen λ der Fall. λ kann als Prophage im E.coli Chromosom integriert vorliegen und mit diesem passiv vermehrt werden. In diesem Zustand sind nahezu alle Phagengene abgeschaltet. Durch Faktoren, die zur Schädigung der Wirts-DNA führen, wie z.B. Bestrahlung mit UV-Licht, kommt es zur Exzision der Phagen-DNA und zur lytischen Vermehrung und Freisetzung von Phagenpartikeln (Lewin, 1985). Die Entscheidung über lytische Vermehrung oder lysogenen Zustand des Phagen kann letztlich auf die Wechselwirkung von zwei verschiedenen DNA-Bindeproteinen mit der λ-DNA zurückgeführt werden (Johnson et al., 1981).

Abbildung 2.2 zeigt einen Ausschnitt aus dem λ-Genom. Im lysogenen Zustand wird nur eines der λ-Gene exprimiert, das cI-Gen, das für den CI-Repressor codiert. Die Transkription des cI-Gens startet am Promotor P_{RM}. Der Bereich dieses Promotors ist in Abbildung 2.2 B vergrößert dargestellt. Neben dem Promotor P_{RM}, von dem ausgehend das CI-Gen in Abb. 2.2 nach links transkribiert wird, befindet sich auf dem dargestellten DNA-Abschnitt ein zweiter Promotor, P_R, von dem aus die Transkription eines zweiten λ Gens, des cro-Gens, nach rechts startet. Mit den beiden divergent angeordneten Promotoren überlappen drei Operatoren, O_R1, O_R2 und O_R3. Der CI-Repressor bindet an diese Opera-

toren (Johnson et al., 1979). Im lysogenen Zustand besetzt der Repressor die Operatoren O_R1 und O_R2. Seine Affinität für den dritten Operator O_R3 ist geringer, so daß dieser zunächst unbesetzt bleibt (Johnson et al., 1979).

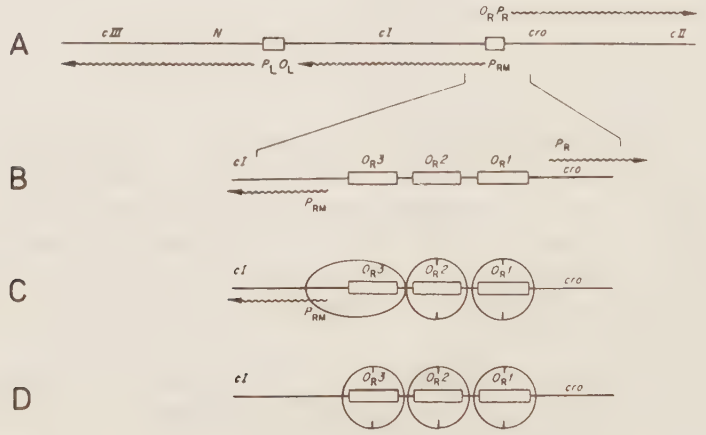


Abb. 2.2: Ausschnitt aus dem Genom des Phagen λ. Teil A: Anordnung der λ - Gene, die vom linken und rechten Operator O_L und O_R ausgehen. Die Startpunkte und die Richtung der Transkription sind durch Pfeile gekennzeichnet. Teil B: Vergrößerung der O_R-Region. Die Region enthält neben den Promotoren P_{RM} und P_R die Operatoren O_R1, O_R2 und O_R3, drei 17 bp lange palindromische Sequenzen . Die Startpunkte der Transkription des cI- und des cro-Gens sind durch die Pfeile dargestellt. Teil C: Die Operatoren O_R1 und O_R2 sind mit CI-Repressor-Dimeren besetzt. Es erfolgt keine von P_R ausgehende Transkription. Die Bindung der RNA-Polymerase an P_{RM} wird erleichtert, das cI-Gen wird vom Promotor P_{RM} aus transkribiert. Teil C: Alle drei Operatoren sind mit CI-Repressor besetzt. Die Transkription ist sowohl von P_R als auch von P_{RM} aus blockiert. Nach Ptashne et al. (1980).

Die Besetzung von O_R1 und O_R2 mit Repressor schaltet das cro-Gen ab, da die Bindestelle für die RNA-Polymerase blockiert ist (Meyer et al., 1980). Gleichzeitig aktiviert der an O_R2 gebundene Repressor den Promotor P_{RM}, indem die Bindung der RNA-Polymerase an diesen erleichtert wird (Abb. 2.2 C) (Meyer und Ptashne, 1980; Meyer et al., 1980). Erst wenn ausreichend Repressor gebildet wird, um auch den dritten

Operator zu besetzen, wird auch das cI-Gen reprimiert (Abb. 2.2 D) (Maurer et al., 1980).

Der Repressor autoreguliert seine Synthese also sowohl positiv als auch negativ, so daß stets eine konstante Konzentration an CI-Repressor in der Zelle vorliegt. Diese ist ausreichend, um sowohl ausgehend vom dargestellten rechten Operator das cro-Gen und die daran anschließenden Gene, als auch von einer zweiten Repressorbindestelle aus, dem linken Operator O_L (Abb. 2.2 A), alle übrigen Phagengene abzuschalten (Ptashne, 1986). Dieser Zustand, der in einer λ-lysogenen Zelle vorliegt (Ptashne et al., 1980), ist stabil, solange der CI-Repressor seine Affinität zu den Operatoren besitzt.

Durch die DNA-schädigende Wirkung von UV-Licht wird diese Affinität zerstört. Das RecA-Protein, das an der DNA-Rekombination beteiligt ist, erhält im Rahmen der SOS-Reaktionen der Zelle (Gottesmann, 1981) eine spezifische Proteaseaktivität (Roberts et al., 1978). Es spaltet das CI-Protein, so daß dieses seine Affinität zur DNA verliert (Johnson et al., 1981). Dadurch werden die Operatoren O_R1, O_R2 und O_R3 frei. Da es nur eine sehr geringe Transkriptionsrate vom R_{RM}-Promotor aus gibt, wenn dieser nicht durch CI aktiviert wird, wird auch kein CI-Repressor nachgebildet (Ptashne, 1986). Nun kann das cro-Gen transkribiert werden. Das Cro-Protein ist ebenfalls ein DNA-Bindeprotein, das an den rechten Operator bindet (Johnson et al., 1978). Im Gegensatz zu CI besitzt es die höchste Affinität zu O_R3 und schaltet durch dessen Besetzung das cI-Gen ab. Steigt die Konzentration an Cro weiter, werden auch O_R2 und O_R1 besetzt und die Transkription von Cro ebenfalls reprimiert. (Meyer et al., 1980; Johnson et al., 1981). In Abwesenheit des CI-Repressors können nun auch die Gene, deren Transkription am linken Promotor P_L beginnt, exprimiert werden. Deren Genprodukte, sowie die der Gene, die im Anschluß an cro vom P_R-Promotor aus transkribiert werden, leiten die Exzision der Phagen-DNA aus dem E.coli Chromosom sowie die lytische Vermehrung des Phagen ein (Ptashne, 1986).

Die Entscheidung zwischen lytischem und lysogenem Zustand wird also von der jeweiligen Besetzung der drei Operatoren O_R1, O_R2 und O_R3 mit den beiden Proteinen CI und Cro bestimmt. Ein einzelnes Protein wie der CI-Repressor kann dabei verschiedene Gene auf unterschiedliche

Weise regulieren. Entscheidend dafür ist zum einen, daß das Protein mehrere Bindestellen auf der DNA besitzt, die es mit unterschiedlicher Affinität erkennt und die dadurch konzentrationsabhängig unterschiedlich besetzt werden. Zum anderen muß die Besetzung der verschiedenen Bindestellen einen unterschiedlichen Einfluß auf die Expression der entsprechenden Gene haben.

Für die divergente Anordnung von zwei Genen mit einer gemeinsamen Regulationsregion sind neben dem Phagen λ auch verschiedene bakterielle Beispiele bekannt (Guha et al., 1971, Piette et al., 1982). Eines davon ist die Tetrazyklin-Resistenzdeterminante des Transposons Tn10 von E.coli (Jorgensen und Reznikoff, 1979). In Abb. 2.3 ist die Anordnung der am Resistenzmechanismus beteiligten Gene auf Tn10 dargestellt.

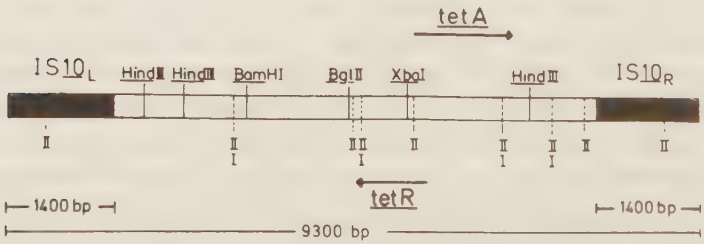


Abb. 2.3: Darstellung des Transposons Tn10. Die Lage der beiden an der Tetrazyklinresistenz beteiligten Gene tetA und tetR ist durch die Pfeile gekennzeichnet. Die beiden IS-Elemente sind durch schwarze Balken dargesteilt. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme HindIII, BamHI, XbaI, BglII, HincII(II) und HpaI(I) sind angegeben.

Das in der Abbildung nach rechts verlaufende Gen tetA codiert für ein 36 kD-Protein, das für die Resistenz verantwortlich ist (Levy und McMurry, 1974; Jorgensen und Reznikoff, 1979) Es ist in der inneren Membran von E.coli lokalisiert und bewirkt den Transport von Tetrazyklin aus der Zelle (McMurry et al., 1980). Die Resistenz wird durch Tetrazyklin induziert (Yang et al., 1976). In Abb. 2.3 nach links ver-

laufend, ist ein zweites Gen lokalisiert, das tetR-Gen, das für ein 21 kD-Protein, den Tet-Repressor, codiert (Wray et al., 1981; Postle et al., 1984). Die Startstellen der Transkription der beiden Gene wurden bestimmt (Bertrand et al., 1983; Hillen et al., 1984). TetA wird von einem Promotor, tetR von zwei Promotoren ausgehend transkribiert. Die Konsensus-Sequenzen der Promotoren sind in Abb. 2.4 dargestellt, die die Sequenz des DNA-Abschnitts zwischen den beiden Genen zeigt (Bertrand et al., 1983; Hillen und Schollmeier, 1983).

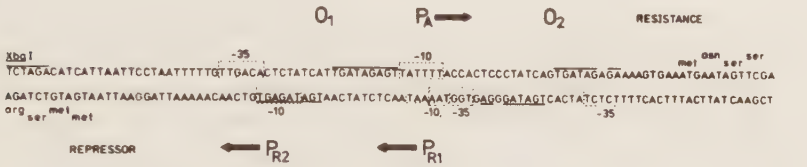


Abb. 2.4: Die Kontrollregion der tet-Gene des Transposons Tn10 von E.coli. Die XbaI-Stelle am linken Rand der Sequenz entspricht der XbaI-Stelle in Abb. 2.3. Die Operatoren sind durch Linien ober- und unterhalb der palindromischen Sequenz gekennzeichnet. Die -35 und -10-Konsensussequenzen der Promotoren sind eingerahmt. Die Bezeichnung der Promotoren ist oberhalb der jeweiligen -10 Region angegeben. Die Leseraster der beiden Proteine sind durch die Aminosäuresequenzen ober- und unterhalb der Nukleotidsequenz angezeigt.

Mit den Promotoren überlappen zwei 19 bp lange palindromische Sequenzen, die in Abb. 2.4 durch Linien über und unter der DNA dargestellt sind. Durch DNaseI-Schutzexperimente wurde gezeigt, daß der Tet-Repressor an die beiden Palindrome, die tet-Operatoren O_1 und O_2, bindet (Hillen et al., 1984). Der Repressor liegt in Lösung als Dimer vor. Je ein Dimer besetzt einen der beiden Operatoren (Hillen et al., 1983). In vitro-Transkriptionsexperimente zeigten, daß die Bindung des Repressors an die beiden Operatoren die Transkription der Gene tetA und tetR reprimiert (Hillen et al., 1984). In Anwesenheit von Tetrazyklin, das an den Tet-Repressor bindet (Takahashi et al., 1986), wird der Repressor-DNA Komplex destabilisiert und die Transkription der Gene tetA und tetR wird nicht mehr durch Repressor blockiert (Hillen

et al., 1983; Hillen et al., 1984).

Aufgrund dieser Daten wurde der in Abb. 2.5 dargestellte Regulationsmechanismus entwickelt.

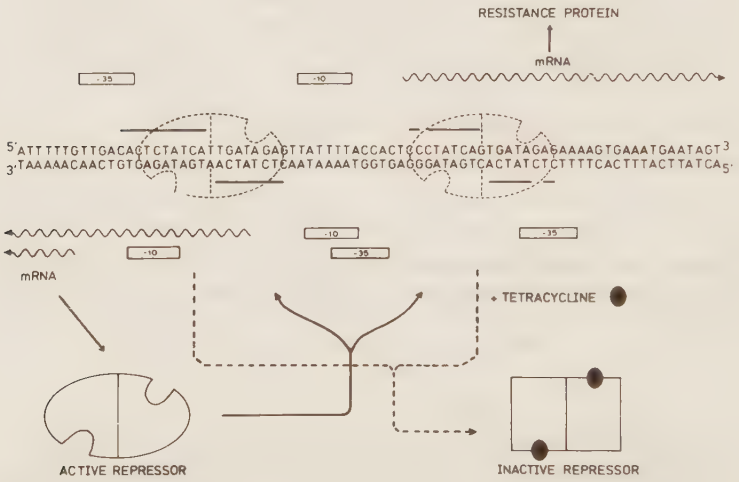


Abb. 2.5: Regulation der Expression der tet-Gene des Transposons Tn10 von E.coli. Die beiden Operatoren sind durch Linien über und unter der Sequenz markiert. Die -10 und -35 Konsensus-Sequenzen der drei Promotoren sind bezeichnet, die Startstellen der mRNAs sind durch den Beginn der Schlangenlinien markiert. Der Repressor bindet als Dimer an die beiden Operatoren und blockiert damit die Transkription seines eigenen Gens und des Gens für das Resistenzprotein. Durch die Bindung von Tetrazyklin wird er in die inaktive Form überführt. Die beiden Operatoren sind frei, die Transkription von den drei Promotoren aus kann erfolgen.

In Abwesenheit von Tetrazyklin bindet der Tet-Repressor an die beiden Operatoren O_1 und O_2 und reprimiert damit sowohl die Expression des tetA-Gens als auch die seines eigenen Gens. Dringt Tetrazyklin in die Zelle ein, bindet es an den Tet-Repressor. Dieser verliert dadurch seine Affinität zu den beiden Operatoren. Die beiden Gene tetA und tetR werden transkribiert, und das TetA-Protein exportiert Tetrazyklin aus der Zelle. Freier Tet-Repressor bindet wieder an O_1 und O_2 und schaltet die Transkription der beiden Gene ab. Der Tet-Repressor regu-

liert also durch die Bindung an die beiden Operatoren sowohl die Expression des tetA-Gens als auch seine eigene Synthese.

Dabei ist nicht bekannt, ob beide Gene gemeinsam an- und abgeschaltet werden, oder ob es auch in diesem System, wie beim Bakteriophagen λ ,eine differentielle Regulation der beiden Gene gibt. Voraussetzung hierfür wäre, daß es einen Affinitätsunterschied des Repressors für die beiden Operatoren gibt und daß die einzelnen Repressor-Operator Komplexe einen unterschiedlichen Einfluß auf die Expression der beiden Gene haben.

Ziel dieser Arbeit war es, die Bindung des Tet-Repressors an die beiden isolierten Operatoren O_1 und O_2 quantitativ und strukturell zu analysieren. Durch gezielte Mutation einzelner Nukleotide der Operatorsequenz sollte deren Einfluß auf die Bindung des Repressors untersucht werden. Es sollte weiterhin geklärt werden, inwieweit neben der Sequenz der beiden Hälften eines Operators der Abstand dieser Hälften zueinander die Bindung des Repressors beeinflußt.

Durch selektive Inaktivierung der beiden Operatoren mit Hilfe gerichteter Mutagenese sollte der Einfluß der einzelnen Repressor-Operator Komplexe auf die Regulation der Gene tetA und tetR untersucht werden. Hierzu sollte die Besetzung mutierter Operatorregionen mit Tet-Repressor *in vitro* charakterisiert und ihre Auswirkung auf die Transkription der beiden Gene *in vivo* analysiert werden.

3 MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Materialien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Adenosintriphosphat	Boehringer, Mannheim
Agarose	Sigma, München
Alkalische Kälberdarmphosphatase	Boehringer, Mannheim
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Amberlite MB3 Ionenaustauscher	Serva, Heidelberg
α-^{32}P-dATP	Amersham, Braunschweig
Brij (Polyoxyethylenmonolaurylether)	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
^{14}C-Galaktosephosphat	Amersham, Braunschweig
Chloramphenicol	Sigma, München
DC-Fertigplatten Kieselgel 60F_{254}	Merck, Darmstadt
DE-52 Säulenmaterial	Whatman, England
DE-81 Papier	Whatman, England
Desoxiribonukleosidtriphosphate	Boehringer, Mannheim
Diisopropylamidite	Applied Biosystems, Darmstadt
DNA-Polymerase1 (Klenow-Fragment)	Boehringer, Mannheim
DNase1	Boehringer, Mannheim
Entwickler für Röntgenfilme	Du Pont, Neu Isenburg
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fixierer für Röntgenfilme	Du Pont, Neu Isenburg
G-50 Sephadex	Pharmacia, Freiburg
GF/A-Filter	Whatmann, England
Glycogen, 901393	Boehringer, Mannheim
γ-^{32}P-ATP	Amersham, Braunschweig
IPTG	Boehringer, Mannheim
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Lysozym	Sigma, München
McConkey-Agar	Serva, Heidelberg
Nitrocellulosefilter BA85	Schleicher und Schüll, Dassel

O-Nitrophenyl-ß-D-Galaktosid	Sigma, München
N,N,N',N',-Methylenbisacrylamid	Serva, Heidelberg
Polyethylenglycol 6000	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Restriktionsendonukleasen	Boehringer, Mannheim
	BRL, Bethesda
	Biolabs, Beverly MA
Ribonuklease A	Sigma, München
Rinderserumalbumin	Sigma, München
Röntgenfilme X-AR	Kodak, England
Sequenzierkit (Maxam und Gilbert)	NEN, Dreieich
Sequenzierkit (Sanger)	Amersham, Braunschweig
Silikonisierlösung	Serva, Heidelberg
T4-DNA-Ligase	Boehringer, Mannheim
T4-DNA-Polynukleotidkinase	Biolabs, Beverly MA
TEMED	Merck, Darmstadt
tRNA	Boehringer, Mannheim
Verstärkerfolie (lightning plus)	Du Pont, Neu Isenburg
X-Gal	Boehringer, Mannheim
Xylencyanol	Serva, Heidelberg

3.2 Allgemeine Medien, Puffer und Lösungen

LB-Medium:
10 g/l Trypton
5 g/l Hefe-Extrakt
10 g/l NaCl
in H_2O, pH 7,3

LB-Agar:
10 g/l Trypton
5 g/l Hefe-Extrakt
8 g/l NaCl
15 g/l Agar
in H_2O, pH 7,3

M9-Medium:

M9-Salze:
6 g/l Na_2HPO_4
3 g/l KH_2PO_4
5 g/l NaCl
10 g/l NH_4Cl
in H_2O, pH 7,4

Zusätze:
20 ml/l 20% Glucose
40 ml/l 10% Casein
1 ml/l 1 M $MgSO_4$
20 mg/l Vitamin B1
Die Zusätze werden als sterile Lösungen nach dem Autoklavieren zugegeben

M9-Agar:

M9-Salze
15 g/l Agar

Zusätze:
10 ml/l 25% Glucose
2 ml/l 1 M $MgSO_4$
1 ml/l 100 mM $CaCl_2$
5 ml/l 100 mM $FeCl_3$
5 mg/l Vitamin B
Die Zusätze werden als sterile Lösungen nach dem Autoklavieren zugegeben.

McConkey-Agar:

50 g/l McConkey Agar (Serva, 48270)

Weich-Agar:

10 g/l Trypton
5 g/l Hefe-Extrakt
8 g/l NaCl
6 g/l Agar
in H_2O, pH 7,3

Antibiotika und Zusätze:	60 mg/l Ampicillin 40 mg/l Kanamycin 40 mg/l X-Gal Ampicillin und Kanamycin wurden in autoklav. H_2O, X-Gal in DMF gelöst und zu den autoklavierten Medien zugegeben
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 0,1 mM EDTA
TEB-Puffer:	60 mM Tris-HCl 60 mM Borsäure 1 mM EDTA pH 8,2
TAE-Puffer:	40 mM Tris-HCl 20 mM Natriumacetat 1,25 mM EDTA pH 8,3
40% Acrylamid/ Bisacrylamid (19:1):	380 g/l Acrylamid 20 g/l N,N,N',N'-Methylenbisacrylamid Die Lösung wurde mit 10 g Amberlite Mischbettionenaustauscher (Serva) vier Stunden bei 4°C gerührt und anschließend abfiltriert. Das Filtrat wurde im Dunkeln auf bewahrt
Phenol:	Phenol wurde auf 60°C erwärmt und mit 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA äquilibriert.

Alle Puffer wurden im zweifach destilliertem Wasser angesetzt und, wenn nötig, wie die Medien autoklaviert.

3.3 E.coli Stämme, Phagen und Plasmide

Die verwendeten Escherichia coli K12-Derivate sind in Tabelle 3.1, die verwendeten Plasmide und M13-Phagen in Tabelle 3.2 zusammengestellt. Tabelle 3.3 zeigt die verwendeten λ-Phagen. In Tabelle 3.4 sind die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide und Phagen zusammengestellt.

Tabelle 3.1: Liste der E.coli Stämme

Stamm	genetische Marker	Referenz
RR1	F^-, hsdS20 (r_B, m_B), recA$^+$, ara-14 proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, supE44, λ^-	Bolivar et el. (1977)
RR1 ΔM15	RR1, lacZ ΔM15	Rüther (1982)
BMH71-18	Δ(lac-proAB), thi, supE, F'(Laci^q, Z ΔM15, proA$^+$B$^+$)	Kramer et al. (1984)
BMH71-18 mut S	BMH71-18, mut S 215:: Tn10	Kramer et al. (1984)
CSH26	ara, Δ(lacpro), thi, F^-	Miller (1972)
XA103	ara, Δprolac, nalA, met8, argEam, nif, supF	Yu und Reznikoff (1984)
WH201	Δ(prolac), supE, thi, nalR, F'(pro$^+$,Δ lacX 74)	L. Wray, pers. Mitlg.
MK30-3	Δ(lac-proAB), recA, galE, strA, F' lacI^q, Z ΔM15, proA$^+$B$^+$	Kramer et al. (1984)
CB454	F^-, Δ lacZ$^-$, lacY$^+$, galK, rpsL, thi, recA56	Schneider und Beck (1986)

Tabelle 3.2: Liste der verwendeten Vektoren

Plasmid/Phage	Größe (Kb)	Marker	Referenz/Herkunft
pCB302a	7,0	Amp^R, *lacZ*, *galK*	Schneider und Beck (1986)
pRT240	4,6	Kan^R, *tetR*	Wray und Reznikoff (1983)
pRT241	4,6	Kan^R, *tetR*	Wray und Reznikoff (1983)
pRT291	4,3	Amp^R	Wissmann et al. (1985)
pUR250	2,7	Amp^R, *lacZ'*	Rüther (1982)
pWH407	7,3	Amp^R, *lacZ*	Yu et al. (1984), Munson (1983)
pWH850	4,4	Amp^R	Wissmann et al. (1986)
pRT301	3,8	Amp^R	Wray und Reznikoff (1983)
M13 mp9	6,4	*lacZ'*	Messing (1983)
M13 mp10	6,4	*lacZ'*	Messing (1983)
M13 mp11	6,4	*lacZ'*	Messing (1983)
M13 mp9rev	6,4	*lacZ'*	Kramer et al. (1984)
mWH6	6,4	*lacZ'*	260 bp *SalI-BamHI* Fragment aus pWH255/1 in M13 mp11, Deletion *NarI-SalI* Fragment. L. Wray, pers. Mitteilung
mWH7	6,6	*lacZ'*	260 bp *SalI-BamHI* Fragment aus pWH255/1 in M13 mp11. 140 bp *BamHI tet*-Fragment in *BamHI* Stelle. L Wray, pers. Mitlg.

Tabelle 3.3: Liste der verwendeten λ-Phagen

Phage	Bemerkungen	Referenz
λplac5·I743	Derivat von λplac5, enthält eine Punktmutation im *lac*-Promotor, ist lac^-	Ippen et al. (1971) Munson et al. (1984) Yu und Reznikoff (1984)
λRZ11	Enthält die W200 *trp-lac*-Fusion, keinen Promotor vor dem *trpB*-Gen, ist lac^-	Yu und Reznikoff (1984) Yu et al. (1984)
λRZ5	Enthält die W205 *trp-lac*-Fusion unter der Kontrolle des *tetA*-Promotors, ist lac^+	Bertrand et al (1984) Wray et al. (1983)

Tabelle 3.4: Liste der konstruierten Plasmide und Phagen

Plasmid/Phage	Größe (kb)	Marker	Herkunft
pWH450	2,8	Amp^R, *lacZ*$^-$	mWH450 *EcoRI*/*HindIII*-Fragment in pUR250
pWH451	2,8	Amp^R, *lacZ*$^-$	mWH451 *EcoRI*/*HindIII*-Fragment in pUR250
pWH452	2,8	Amp^R, *lacZ*$^-$	mWH452 *EcoRI*/*HindIII*-Fragment in pUR250
pWH453	2,8	Amp^R, *lacZ*$^-$	mWH453 *EcoRI*/*HindIII*-Fragment in pUR250
pWH460	4,2	Amp^R	mWH450 *EcoRI*/*HindIII*-Fragment in pRT291
pWH460(OM1)	4,2	Amp^R	mWH451 *EcoRI*/*HindIII*-Fragment in pRT291
pWH460(OM2)	4,2	Amp^R	mWH452 *EcoRI*/*HindIII*-Fragment in pRT291
pWH460(OM3)	4,2	Amp^R	mWH453 *EcoRI*/*HindIII*-Fragment in pRT291
pWH464	4,2	Amp^R	mWH454 *EcoRI*/*HindIII*-Fragment in pRT291
pWH465	4,2	Amp^R	mWH455 *EcoRI*/*HindIII*-Fragment in pRT291
pWH470	7,4	Amp^R, *lacZ*	mWH460 *BamHI*-Fragment in pWH407
pWH471	7,4	Amp^R, *lacZ*	mWH461 *BamHI*-Fragment in pWH407
pWH472	7,4	Amp^R, *lacZ*	mWH462 *BamHI*-Fragment in pWH407
pWH473	7,4	Amp^R, *lacZ*	mWH463 *BamHI*-Fragment in pWH407
pWH480	7,1	Amp^R, *lacZ*, *galK*	mWH460 *BamHI*-Fragment in pCB302a, *tetA-lacZ*
pWH481	7,1	Amp^R, *lacZ*, *galK*	mWH461 *BamHI*-Fragment in pCB302a, *tetA-lacZ*
pWH482	7,1	Amp^R, *lacZ*, *galK*	mWH462 *BamHI*-Fragment in pCB302a, *tetA-lacZ*
pWH483	7,1	Amp^R, *lacZ*, *galK*	mWH463 *BamHI*-Fragment in pCB302a, *tetA-lacZ*
pWH851	4,4	Amp^R	350 bp O_2-Fragment in pRT291/*EcoRI*
mWH450	6,4	*lacZ*$^-$	Oligonukleotid OM in *HincII* Stelle von M13 mp11
mWH451	6,4	*lacZ*$^-$	Oligonukleotid OM1 in *HincII* Stelle von M13 mp11
mWH452	6,4	*lacZ*$^-$	Oligonukleotid OM2 in *HincII* Stelle von M13 mp11
mWH453	6,4	*lacZ*$^-$	Oligonukleotid OM3 in *HincII* Stelle von M13 mp11
mWH454	6,4	*lacZ*$^-$	Oligonukleotid O_1^{-1} in *SmaI* Stelle vom M13 mp10
mWH455	6,4	*lacZ*$^-$	Oligonukleotid O_1^{+1} in *SmaI* Stelle von m13 mp10

Plasmid/Phage	Größe (kb)	Marker	Herkunft
mWH460	6,5	lacZ⁻	140 bp BamHI-tet-Fragment in M13 mp9
mWH461	6,5	lacZ⁻	mWH460 mit O_1^C-Mutation
mWH462	6,5	lacZ⁻	mWH460 mit O_2^C-Mutation
mWH463	6,5	lacZ⁻	mWH460 mit $O_1^C O_2^C$-Mutation
mWH480	6,5	lacZ'	mWH460 BamHI-Fragment in mWH6, tetA-lacZ
mWH481	6,5	lacZ'	mWH461 BamHI-Fragment in mWH6, tetA-lacZ
mWH482	6,5	lacZ'	mWH462 BamHI-Fragment in mWH6, tetA-lacZ
mWH483	6,5	lacZ'	mWH463 BamHI-Fragment in mWH6, tetA-lacZ
mWH490	6,5	lacZ'	mWH460 BamHI-Fragment in mWH6, tetR-lacZ
mWH491	6,5	lacZ'	mWH461 BamHI-Fragment in mWH6, tetR-lacZ
mWH492	6,5	lacZ'	mWH462 BamHI-Fragment in mWH6, tetR-lacZ
mWH493	6,5	lacZ'	mWH463 BamHI-Fragment in mWH6, tetR-lacZ
λWH470	50	lacZ	Rekombination pWH470 mit λRZ11
λWH471	50	lacZ	Rekombination pWH471 mit λRZ11
λWH472	50	lacZ	Rekombination pWH472 mit λRZ11
λWH473	50	lacZ	Rekombination pWH473 mit λRZ11
λWH480	50	lacZ	Rekombination mWH480 mit λplac5-T743
λWH481	50	lacZ	Rekombination mWH481 mit λplac5-T743
λWH482	50	lacZ	Rekombination mWH482 mit λplac5-T743
λWH483	50	lacZ	Rekombination mWH483 mit λplac5-T743
λWH490	50	lacZ	Rekombination mWH490 mit λplac5-T743
λWH491	50	lacZ	Rekombination mWH491 mit λplac5-T743
λWH492	50	lacZ	Rekombination mWH492 mit λplac5-T743
λWH493	50	lacZ	Rekombination mWH493 mit λplac5-T743

3.4 Detektion von ß-Galaktosidaseaktivität auf Platten

40 µg/ml X-Gal wurde zu LB-Agar und 300 µg/ml zu Weich-Agar zugesetzt. Galaktosidase-positive Kolonien bzw. Plaques sind auf diesem Medium durch ihre Blaufärbung detektierbar. Im Falle einer induzierbaren ß-Galaktosidaseaktivität enthielten die Platten bzw. der Weich-Agar zusätzlich 300 µM IPTG.

McConkey-Platten wurden nach Angaben des Produzenten hergestellt. ß-Galaktosidase-positive Kolonien sind auf ihren durch ihre Rotfärbung erkennbar, während ß-Galaktosidase-negative Kolonien weiß sind.

3.5 Transformation von E.coli Stämmen

3.5.1 Herstellen von kompetenten Zellen

Eine 20 ml LB-Kultur wurde mit 200 µl einer gesättigten Übernachtkultur des entsprechenden Stammes beimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei einer Zelldichte, die A_{260} = 0,6 entspricht, wurde die Kultur für 10 min auf Eis abgekühlt und in sterile Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen 10 min bei 6000 rpm in einer Heraeus Christ Minifuge GL bei 4°C sedimentiert. Die Zellen wurden in 10 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$-Lösung suspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml 0,1 M $CaCl_2$-Lösung suspendiert und für mindestens 20 min auf Eis inkubiert.

Sollten die Zellen nicht direkt zur Transformation eingesetzt werden, wurde die Suspension auf 15% Glycerin eingestellt und bei -70°C eingefroren.

3.5.2 Transformation der kompetenten Zellen

Pro Transormationsansatz wurden 200 µl der kompetenten Zellen eingesetzt. Nach Zugabe der DNA (in typischen Fällen 0,1 µg in 10-20 µl) wurden die Ansätze 30 sec auf 42°C erhitzt, 90 min auf Eis inkubiert, anschließend mit 4 ml LB-Medium versetzt und 60 min bei 37°C geschüt-

telt.

Jeweils 200 µl wurden auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika und Zusätzen ausplattiert. Nach einer Inkubation von 14 h bei 37°C wurden die Transformanden auf Selektionsmedium vereinzelt und erneut 14 h bei 37°C inkubiert.

3.6 Schnellpräparation von Plasmiden

3.6.1 Schnellpräparation von Plasmiden aus einem Bakterienrasen

Etwa 50 µl Zellen wurden mit der Impföse vom Bakterienrasen einer Platte abgekratzt und in 70 µl Aufschlußpuffer suspendiert. Nach Zugabe von 7 µl Lysozymlösung (20 mg/ml in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) und einer Inkubation von 1-2 min bei Raumtemperatur wurden die Proben für 40 sec im Wasserbad auf 90°C erhitzt. Anschließend wurde die Proben sofort 15 min bei 12 000 rpm in einer Hettich-Zentrifuge zentrifugiert und die sedimentierten Zelltrümmer mit einem sterilen Zahnstocher entfernt. Der Überstand wurde mit 80 µl Isopropanol versetzt, durchmischt und 20 min auf Eis inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 12 000 rpm wurde das Sediment 2 mal mit 1 ml Ethanol gewaschen, 5 min in Vakuum getrocknet und in 20 µl TE aufgenommen. Die Proben wurden zur Analyse auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisiert (Kap. 3.13.1).

3.6.2 Schnellpräparation von Plasmiden aus Flüssigkulturen

Je 4 ml einer gesättigten LB-Kultur wurden 10 min bei 6 000 rpm in einer Heraeus Christ Minifuge GL bei 4°C sedimentiert. Das Zellsediment wurde in 500 µl Aufschlußpuffer suspendiert, mit 35 µl Lysozymlösung versetzt und die Proben 1-2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 40-sekündigem Erhitzen auf 90°C im Wasserbad wurden die Proben sofort für 15 min bei 12 000 rpm in einer Hettich-Zentrifuge zentrifugiert. Die sedimentierten Zelltrümmer wurden mit einem sterilen Zahnstocher entfernt und der Überstand mit 500 µl Isopropanol versetzt und

durchmischt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurde für 5 min in einer Hettich-Zentrifuge bei 12 000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde 2 mal mit je 1 ml Ethanol gespült und für 5 min in Vakuum getrocknet. Anschließend wurde das Sediment in 20 µl TE-Puffer aufgenommen. Sollte die DNA für Restriktionsverdauungen verwendet werden, wurde an die Isopropanol-Fällung eine PEG-Fällung (Kap. 3.11.1) angeschlossen.

Aufschlußpuffer: 8% Saccharose
5% Triton
50 mM EDTA
50 mM Tris-HCl, pH 8,0

3.7 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmiden erfolgte im Prinzip nach der von Hardies et al. (1979) beschriebenen Methode. 20 ml LB-Medium, mit dem entsprechenden Antibiotikum wurde mit einer Kolonie beimpft. Die Kultur wurde 14-16 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde 1 l LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit der 20 ml-Kultur angeimpft und für 14-16 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

Die Zellen wurden durch 20-minütige Zentrifugation bei 6 000 rpm und 4°C in einem Beckman JA 10 Rotor sedimentiert. Alle weiteren Volumenangaben beziehen sich auf die Menge Zellsediment aus 500 ml Kulturflüssigkeit. Die Zellen wurden in 12 ml 25%iger Saccharose-Lösung in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 suspendiert und in 25 ml-Polycarbonatröhrchen überführt. Nach Zugabe von 3 ml 0,5 M EDTA und 3 ml Lysozym-Lösung (20 mg/ml Lysozym in 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) wurden die Röhrchen geschüttelt und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 2 ml Brij/Doc-Lösung zugegeben, die Röhrchen 2 mal invertiert und nach genau 10 min auf Eis in einem Beckman Ti 55.2 Rotor für 30 min bei 40 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde dekantiert. RNase A wurde zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml Lösung zugegeben und die Proben 30 min auf Eis inkubiert. Die RNaseA wurde als Stammlösung mit einer Konzentration von 20 mg/ml in 100 mM Natriumace-

tat pH 5,5 angesetzt und zur Inaktivierung von DNasen 10 min bei 100°C inkubiert. Anschließend wurde eine PEG-Fällung durchgeführt. Die Ansätze wurden mit einem halben Volumen PEG-Lösung versetzt, durchmischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 10 000 rpm und 4°C in einem Beckman JA 17 Rotor wurde der Überstand möglichst rückstandlos entfernt. Das Sediment wurde in 5 ml TE-Puffer gelöst. Die Lösung wurde auf 0,5% SDS eingestellt und Proteinase K wurde auf eine Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben. Die verwendete Stammlösung hatte eine Konzentration von 20 mg/ml in H_2O. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Proben 3 mal mit Phenol und 3 mal mit Diethylether extrahiert. Anschließend wurde eine zweite PEG-Fällung durchgeführt, das DNA-Sediment mit Ethanol gespült, im Vakuum getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde durch Messung der UV-Absorption (Kap. 3.29) bestimmt.

Brij/Doc-Lösung:	2 Teile 10% Brij-Lösung
	1 Teil 10% Desoxycholat-Lösung
PEG-Lösung	30% PEG in 1,5 M NaCl

3.8 Klonierung mit dem E.coli-Phagen M13

3.8.1 Anzucht von M13 Phagen

Für alle Arbeiten mit M13-Vektoren wurde der Stamm E.coli BMH71-18 (Tab. 3.1) verwendet. 2 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie E.coli BMH71-18 beimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit 100 ml dieser Kultur wurden erneut 2 ml LB-Medium beimpft und unter Schütteln für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers mit einem Plaque beimpft und die Inkubation für 6-8 h bei 37°C unter Schütteln fortgesetzt. Nach Beendigung der Inkubationsszeit wurde die Kultur 10 min bei 12 000 rpm in einer Hettich-Zentrifuge zentrifugiert und der Überstand in neue Eppendorfgefäße überführt. Er enthielt im typischen Fall 10^{10}-10^{11} Phagen/ml. Der so gewonnene Phagenüberstand konnte bei 4°C im

Kühlschrank für mehrere Monate aufbewahrt werden.

3.8.2 Präparation von einzelsträngiger M13-DNA

1,2 ml Phagenüberstand wurden für 10 min bei 12 000 rpm in einer Hettich-Zentrifuge zentrifugiert, um Bakterienreste zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 300 µl 20% PEG in 2,5 M NaCl wurde 30 min auf Eis inkubiert. Die Phagen wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 12 000 rpm in einer Hettich-Zentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde abgezogen, die Proben erneut 1 min zentrifugiert und Reste des Überstandes möglichst vollständig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgezogen. Das Sediment wurde in 100 µl 0.3 M NaOAc aufgenommen, und je einmal mit 100 µl Phenol und mit 300 µl Diethylether extrahiert. Nach Zugabe von 300 µl Ethanol und Durchmischung wurde die Probe für 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend für 10 min bei 12 000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 1 ml Ethanol gespült und für 5 min im Vakuum getrocknet. Die DNA wurde in 20 µl TE-Puffer aufgenommen. 2-10 µg einzelsträngiger DNA konnten auf diese Art aus 1-2 ml Phagenüberstand isoliert werden.

3.8.3 Präparation von doppelsträngiger M13-DNA

Doppelsträngige M13-DNA ("RF-DNA") wurde nach der gleichen Methode wie Plasmid-DNA (Kap. 3.7) aus 1 l Bakterienkultur isoliert. Hierzu wurden zunächst 20 ml einer logarithmisch wachsenden E.coli-Kultur bei einer Zelldichte, die 0,6 A_{600}-Einheiten entspricht mit 0,5 ml Phagenüberstand angeimpft und 6-8 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde die Zellsuspension auf zwei sterile 10 ml-Röhrchen verteilt, 10 min bei 6 000 rpm in einer Heraeus Christ Minifuge GL zentrifugiert und der Überstand in neue Röhrchen überführt. 10 ml des so gewonnenen Phagenüberstandes wurden verwendet, um 1 l einer logarithmisch wachsenden E.coli-Kultur in LB-Medium bei einer Zelldichte, die 0,6 A_{600}-Einheiten entspricht, anzuimpfen. Die Kultur wurde für 6-8 h unter

Schütteln bei 37°C weiter inkubiert und anschließend wie in Kap. 3.7 beschrieben aufgeschlossen. Da auf diese Art auch M13-Einzelstrang DNA mitisoliert wird, wurde zur weiteren Aufreinigung eine CsCl-Dichtegradienten-Zentrifugation angeschlossen (Kap. 2.27). Die Ausbeuten betrugen im typischen Fall 100-500 µg RF-DNA pro Liter Bakterienkultur.

3.8.4 Transformation von E.coli mit M13 RF-DNA

Zur Transformation mit M13 RF-DNA wurde E.coli BMH71-18 wie in Kap. 3.5.1 beschrieben kompetent gemacht. 200 µl Zellen wurden mit 10-20 µl der DNA und 100 µl 0,1 M $CaCl_2$ in einem sterilen Eppendorf-Gefäß gemischt, 30 sec auf 42°C erhitzt und 90 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 1:10 und 1:100 Verdünnungen der Transformationsansätze in 0,1 M $CaCl_2$ hergestellt. Pro Platte wurden 3 ml Weich-Agar in sterilen Röhrchen in einem Wasserbad bei 45°C flüssig gehalten. Pro Weich-Agar-Röhrchen wurden folgende Komponenten zugegeben:

10 µl 100 mM IPTG
50 µl 2% X-Gal in DMF
200 µl BMH71-18 Zellen in LB-Medium (log. Wachstumsphase)
200 µl Transformationsansatz bzw. Verdünnung

Die Ansätze wurden auf einem Vortex-Rührer durchmischt und auf LB-Platten aufgeschichtet. Nach Erstarren der Weich-Agar-Schicht wurden die Platten für 14 h bei 37°C inkubiert.

3.8.5 Minipräparation von M13 RF-DNA

Um die RF-DNA aus Transformanden zu isolieren wurden Bakterienkulturen im 30 ml-Maßstab verwendet, die mit 0,5 ml Phagenüberstand infiziert wurden (Kap. 3.8.1). Nach 6-8 h wurden die Zellen für 10 min bei 6 000 rpm und 4°C in einer Heraeus Christ Minifuge GL abzentrifugiert.

Das Zellsediment aus 15 ml Kultur wurde in 500 µl 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 suspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zugabe

von 50 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) wurden die Proben 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Phenol zugegeben, die Gefäße 3 mal invertiert und 15 min bei 12 000 rpm in einer Hettich-Zentrifuge zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 300 µl Phenol auf einem Vortex-Rührer durchmischt und erneut für 5 min bei 12 000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgezogen und mit 1 ml Ethanol versetzt. Nach 5-minütigem Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurde 15 min bei 12 000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgezogen, das Sediment mit 1 ml Ethanol gespült und für 5 min im Vakuum getrocknet. Das Sediment wurde in 300 µl TE-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 5 µl einer RNaseA-Lösung (10 mg/ml in 100 mM NaOAc, pH 5,5, 10 min auf 100°C erhitzt) 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 15 µl 20%iges SDS und 5µl Proteinase K-Lösung (20 mg/ml in H_2O) zugegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden dreimal mit 300 µl Phenol und zweimal mit 750 µl Diethylether extrahiert und anschließend einmal mit PEG und einmal mit Ethanol gefällt (Kap. 3.11). Das DNA-Sediment wurde nach der letzten Fällung in 100 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Ausbeuten lagen bei dieser Methode bei 10-30 µg DNA aus einer 30 ml Kultur.

3.9 Arbeiten mit dem E.coli-Phagen λ

Alle verwendeten Phagen tragen die genetischen Marker cI857 und Sam7. cI857 ist eine Mutation im cI-Gen, die zu einem temperatursensitiven CI-Repressor führt. Phagen mit dieser Mutation können bei 32°C lysogen sein, bei 37°C wird der lytische Cyclus induziert. Sam7 ist eine Ambermutation im S-Gen, dessen Produkt für die Lyse der Wirtsbakterien verantwortlich ist. Phagen mit dieser Mutation bilden nur auf solchen E.coli-Stämmen Plaques, die den Marker supF tragen, also eine Amber-Supressor-tRNA synthetisieren. Die verwendeten Phagen sind in Tabelle 3.3 aufgelistet.

3.9.1 Anzucht von λ-Phagen

λ-Phagen infizieren E.coli über das Maltose-Transportsystem (Maniatis et al., 1982). E.coli Zellen, die zur lytischen Vermehrung von λ verwendet werden sollten, wurden deshalb in λ-Medium angezogen, das Maltose als Kohlenstoffquelle enthält.

200 µl einer gesättigten Übernachtkultur von E.coli XA103 in λ-Medium wurden mit einem sterilen Zahnstocher mit einem Plaque beimpft. Zur Präadsorption der Phagen wurde 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 4 ml LB-Medium zugegeben und die Kultur für 6-9 Stunden, bzw. bis zum Eintreten der Lyse, bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde in ein steriles 10 ml-Röhrchen überführt, mit 3 Tropfen Chloroform versetzt und auf einem Vortex-Rührer heftig geschüttelt. Anschließend wurde für 10 min bei 6 000 rpm und 4°C in einer Heraeus-Christ Minifuge GL zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues steriles Röhrchen überführt.

Das so gewonnene Phagenlysat enthielt zwischen 10^9 und 10^{11} Phagen/ml und konnte bei 4°C für mehrere Monate gelagert werden.

λ-Medium:
1,0% Trypton
0,5% Hefe-Extrakt
1,0% NaCl
0,4% Maltose
10 mM $MgSO_4$

3.9.2 Induktion von lysogenen λ-Phagen

Um λ Phagen aus lysogenen Stämmen zu isolieren, mußte zunächst der lytische Zyklus induziert werden, in dessen Verlauf es zur Vermehrung der Phagen kommt.

Die lysogenen Stämme wurden bei 32°C in 4 ml LB-Medium für 14 h inkubiert. Mit 100 µl dieser gesättigten Kulturen wurden 4 ml LB-Medium beimpft und die Kulturen bei 32°C unter Schütteln inkubiert, bis eine Zelldichte, die 0,8 A_{600}-Einheiten entspricht, erreicht war. Die Temperatur wurde auf 42°C erhöht und die Kulturen 15 min heftig

geschüttelt. Anschließend wurden die Kulturen zur Phagenvermehrung für weitere 3 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Kulturen wurden in sterile 10 ml Röhrchen überführt und wie in Kap. 3.9.1 beschrieben weiterbehandelt.

3.9.3 Minipräparation von λ-DNA

Die Minipräparation von λ-DNA wurde nach Maniatis et al. (1982) durchgeführt. 2 ml Phagenlysat wurden mit RNaseA-Lösung und DNaseI-Lösung zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml 20% PEG, 2 M NaCl in SM wurden die Proben für 1 h auf Eis gestellt. Die Phagen wurden durch eine 20-minütige Zentrifugation bei 6 000 rpm und 4°C in einer Heraeus-Christ Minifuge GL präzipitiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig entfernt. Das Sediment wurde in 0,5 ml SM suspendiert und die Probe 2 min bei 6 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mit 5 µl 10%igem SDS und 5 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei 68°C wurden die Proben je einmal mit je 500 µl Phenol, Phenol / Chloroform (1:1) und Chloroform extrahiert. Der Überstand wurde nach jeder Extraktion in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt.

Anschließend wurden 500 µl Isopropanol zugegeben, die Proben durchmischt und 20 min bei -70°C eingefroren. Die DNA wurde durch 15-minütige Zentrifugation bei 12 000 rpm und 4°C in einer Hettich-Zentrifuge sedimentiert, der Überstand abgezogen und das Sediment mit 1 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Nach 5-minütigem Trocknen im Vakuum wurde die DNA in 50 µl TE-Puffer gelöst.

SM:	100 mM NaCl
	10 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
	50 mM Tris-HCl, pH 7,5
	0,01% Gelatine
RNaseA-Lösung:	100 µg/ml in 100 mM Natriumacetat, pH 5,5
	10 min auf 100°C erhitzt
DNaseI-Lösung:	100 µg/ml in H_2O

3.9.4 Homologe Rekombination

Durch Rekombination zwischen λ-Phagen einerseits und Plasmiden bzw. M13-Derivaten andererseits wurden genetische Konstruktionen auf λ übertragen. Bei den hier beschriebenen Rekombinationen erhielten die λ Phagen dadurch einen lac$^+$-Phänotyp und konnten auf X-Gal-haltigem Medium erkannt werden (Kap. 3.4).

3.9.4.1 Rekombination zwischen M13-Derivaten und λ-Phagen

Zur Rekombination zwischen M13 und λ wurde der Stamm WH201 verwendet (Kap. 3.3). Dieser Stamm ist F$^+$, trägt aber ein F-Plasmid, auf dem das komplette lac-Operon deletiert wurde, um Rekombinationen zwischen dem F-Plasmid und λ lac-Phagen zu verhindern.

Eine 4 ml Kultur von E.coli WH201 in LB-Medium wurde über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 20 µl der gesättigten Kultur wurden mit 1 µl M13-Phagenüberstand gemischt, 4 ml λ-Medium damit angeimpft und die Kultur über Nacht bei 37°C geschüttelt.

Zu 200 µl der Kultur wurden 10-20 µl λ-Phagenüberstand (ca. $5x10^8$ Phagen) gegeben. Der Ansatz wurde zur Präadsorption der λ-Phagen 15 min bei 37°C inkubiert, mit 4 ml LB-Medium versetzt und 3 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt, mit 3 Tropfen Chloroform versetzt und auf einem Vortex-Rührer heftig geschüttelt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 6 000 rpm und 4°C in einer Heraeus-Christ Minifuge GL wurde der Überstand in ein neues, steriles Röhrchen überführt.

Der Phagenüberstand wurde auf E.coli XA103 ausplattiert (Kap. 3.3). E.coli XA103 trägt kein F-Teilchen, kann also nur von λ, nicht von M13 infiziert werden. Von einer gesättigten Kultur von E.coli XA103 in λ-Medium wurden je 200 µl mit 20 µl Phagenüberstand bzw. entsprechenden Verdünnungen in SM gemischt und 15 min bei 37°C inkubiert (Präadsorptionsmix). Pro Plattierung wurden 3 ml Weich-Agar in sterilen Röhrchen in einem Wasserbad bei 45°C flüssig gehalten. 50 µl 2% X-Gal in DMF und der Präadsorptionsmix wurden zugegeben, der Röhrcheninhalt auf einem Vortex-Rührer durchmischt und auf LB-Platten aufgeschichtet. Nach Erstarren der Weich-Agarschicht wurden die Platten für 8-14 h bei

37°C inkubiert. λ lac-Phagen wurden als blaue Plaques identifiziert.

3.9.4.2 Rekombination zwischen Plasmiden und λ-Phagen

Die Plasmide wurden auf E.coli CSH26 (Kap. 3.3) transformiert. Die Stämme wurden über Nacht bei 37°C in 4 ml λ-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum inkubiert. 200 µl der gesättigten Kulturen wurden mit 20 µl λ-Phagenüberstand versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 4 ml LB-Medium zugegeben und 3 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Kulturen wurden in sterile Zentrifugenröhrchen überführt, der Phagenüberstand wie in Kap. 3.9.4.1 beschrieben gewonnen und auf E.coli XA103 ausplattiert.

Alternativ wurde ein λ-lysogener CSH26-Stamm verwendet und mit den Plasmiden transformiert (Kap. 3.5). Eine 4 ml LB-Medium Kultur mit dem entsprechenden Antibiotikum wurde beimpft und über Nacht bei 32°C unter Schütteln inkubiert. 40µl der gesättigten Kultur wurden in 4 ml LB-Medium überführt und die Kultur bis zu einer Zelldichte, die 0,8 A_{600}-Einheiten entspricht, bei 32°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur auf 42°C erhöht, die Kultur 15 min heftig geschüttelt und die Inkubation für 3 h bei 37°C fortgesetzt. Die Kultur wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und wie in Kap. 3.9.4.1. beschrieben weiterbehandelt.

3.9.5 Konstruktion von λ-lysogenen Stämmen

Diese Methode ist dann anwendbar, wenn der integrierte λ-Phage dem Stamm einen phänotypischen Marker verleiht. Im hier beschriebenen Fall wurden lac^+-Phagen in einen lac^--Bakterienstamm integriert. Als Stamm wurde E.coli CSH26 verwendet. Dieser Stamm besitzt keine Supressor-tRNA, wird von λ Sam7-Phagen also nicht lysiert. Somit kommt es zu keiner Freisetzung von λ-Phagen im Verlauf der Inkubation.

E.coli CSH26 wurde in 4 ml λ-Medium (Kap. 4.9.1) für 14 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 200 µl einer gesättigten Kultur wurden mit 20 µl Phagenlysat gemischt und 15 min bei 37°C zur Präadsorption inkubiert. Anschließend wurden 4 ml LB-Medium zugegeben und die Kultur 1,5

bis 2 h bei 32°C unter Schütteln inkubiert. Mit einer Impföse wurden Zellen auf LB-Platten mit 40 mg/l X-Gal ausgestrichen. Die Platten wurden bei 32°C für 36-48 h inkubiert. λ-lysogene Kolonien erscheinen blau auf einem Rasen an weißen Zellen. Sie wurden auf LB-Platten mit 40 mg/l X-Gal vereinzelt und auf Lysogenie getestet. Hierzu wurden die Stämme auf je 2 Platten ausgestrichen, wovon eine bei 32°C und eine bei 42°C inkubiert wurde. Aufgrund der Mutation im CI-Gen wachsen die λ-lysogenen Stämme nur bei 32°C.

3.10 Aktivitätsbestimmung von Enzymen

3.10.1 Bestimmung der ß-Galaktosidaseaktivität

Die Aktivitätsbestimmung (Miller, 1972) beruht auf der Umsetzung von O-Nitrophenyl-ß-D-Galaktosid (ONPG) zu Galaktose und O-Nitrophenol. O-Nitrophenol absorbiert bei 420 nm und kann somit photometrisch quantifiziert werden.

Je drei 4ml-LB-Kulturen mit den entsprechenden Antibiotika wurden von jedem Stamm angeimpft und über Nacht bei 37°C bzw. 32°C inkubiert. Je 40 µl wurden hieraus in eine neue 4 ml Kultur überimpft und solange inkubiert, bis eine Zelldichte erreicht war, die 0,3-0,4 A_{600}-Einheiten entspricht. Die Kulturen wurden für 20 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden Aliquots von 10 µl bis 500 µl, abhängig von der erwarteten Enzymaktivität, mit Z-Puffer auf 1 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von je zwei Tropfen Chloroform und einem Tropfen 0,1% SDS wurden die Röhrchen 10 sec geschüttelt und anschließend 30-60 min bei 30°C inkubiert. Inzwischen wurde die Zelldichte der auf Eis stehenden Kulturen durch Messung der Absorption bei 600 nm bestimmt. Anschließend wurden je 200 µl ONPG-Lösung (4 mg/ml in Z-Puffer) zu den auf 30°C erwärmten Proben gegeben.

Die Proben wurden solange bei 30°C weiterinkubiert, bis eine deutliche Gelbfärbung erkennbar war. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml 1 M $NaCO_3$ gestoppt, und die Zeitspanne zwischen Start und Stop wurde notiert. Die Absorption bei 420 nm und 550 nm wurde bestimmt (Kap. 3.28). Als Referenz wurde eine gleichbehandelte Probe verwendet,

bei der die Zellmenge durch LB-Medium ersetzt wurde. Die Aktivität wurde durch folgende Formel berechnet:

$$\text{Units} = \frac{A_{420} - 1{,}75 \times A_{550}}{A_{600} \times t \times \text{Vol}} \times 1000$$

A_{420}: Absorption von O-Nitrophenol
A_{550}: Lichtstreuung durch Zelltrümmer
A_{600}: Zelldichte
Vol: das eingesetzte Volumen an Zellen in ml
t: Zeitspanne zwischen Start und Stop der Reaktion in Minuten
1,75: Korrekturfaktor für die Lichtstreuung durch Zelltrümmer bei 420 nm

Z-Puffer:
60 mM $Na_2 H PO_4$
40 mM $Na H_2 PO_4$
10 mM KCl
1 mM $MgSO_4$
50 mM Mercaptoethanol
pH 7,0

3.10.2 Bestimmung der Galaktokinaseaktivität

Das Prinzip der Messung beruht auf der Umsetzung von ^{14}C-markierter Galaktose zu ^{14}C-Galaktosephosphat und der Trennung von Galaktose und Galaktosephosphat an einem Anionenaustauscher-Papier. Die Menge an gebildetem Galaktosephophat kann dann über die Menge der gebundenen Radioaktivität bestimmt werden (Schneider und Beck, 1986).

Je drei 4 ml-Kulturen mit M9-Medium und den entsprechenden Antibiotika wurden angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Je 40 µl dieser Kulturen wurden erneut in 4 ml M9-Medium mit Antibiotika überimpft und inkubiert, bis die Zelldichte 0,5 A_{600}-Einheiten entsprach. Die Kulturen wurden für 10 min auf Eis abgekühlt. Je 2 ml wurden in sterile Röhrchen überführt und für 10 min bei 6 000 rpm

und 4°C in einer Heraeus-Christ Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Röhrchen zum vollständigen Entfernen des Überstandes invertiert auf Papiertücher gestellt. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml Sonifikationspuffer aufgenommen. Die Proben wurden für 4 x 10 sec auf Eis sonifiziert und anschließend weiter auf Eis gestellt. Inzwischen wurde die Zelldichte der auf Eis stehenden Kulturen durch Messung der Absorption bei 600 nm bestimmt.

Je 60 µl der Lysate bzw. entsprechende Verdünnungen in Verdünnungspuffer wurden bei 37°C für 10-15 min erwärmt. Anschließend wurden 40 µl Reaktionsmix zugegeben, die Proben durchmischt und bei 37°C inkubiert. Nach 30 min wurden 30 µl auf 1,5 x 1,5 cm große DE-81 Filter pipettiert und die Filter nach 1-2 min in 80% Ethanol gegeben. Die Filter wurden dreimal 1 min in H_2O und einmal 5 min in absolutem Ethanol gewaschen, getrocknet und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt (Kap. 3.28). Um die Umsatzrate zu bestimmen, wurden aus drei beliebigen Proben 30 µl auf einen zweiten Filter pipettiert, der direkt getrocknet wurde. Zur Bestimmung des Blindwertes wurden Proben mitbehandelt, bei denen das Zellysat durch 60 µl Verdünnungspuffer ersetzt wurde.

Die Umsatzrate errechnet sich als:

$$\text{Umsatzrate} = \frac{\text{cpm Probe - cmp Blindwert}}{\text{cmp gesamt}}$$

Die Aktivität der Galaktokinase wurde nach folgender Formel berechnet:

$$U = \frac{\text{Umsatzrate} \cdot 146}{A_{600} \times 30 \times \text{Vol}}$$

A_{600}: Zelldichte
30: Reaktionszeit (min)
Vol: eingesetztes Volumen an Zellysat (ml)
146: Proportionalitätsfaktor

Um Linearität sicherzustellen, sollte weniger als die Hälfte der eingesetzten Galaktose umgesetzt worden sein.

Sonifikationspuffer:	50 mM Tris-HCl, pH 7,9
	4 mM EDTA
	2 mM DTT
Verdünnungspuffer:	50 mM Tris-HCl, pH 7,9
	4 mM EDTA
	50 µg/ml BSA
Reaktionsmix:	32 µl ^{14}C-Galaktose (49,4 mCi/mmol)
	570 µl 31 mM Galaktose
	960 µl 40 mM NaF
	1200 µl 15 mM ATP
	240 µl 200 mM $MgCl_2$
	600 µl 200 mM DTT
	1200 µl 1 M Tris-HCl, pH 7,8

Volumenangaben für 120 Proben

3.11 Fällung von Nukleinsäuren

3.11.1 Fällung mit Polyethylenglycol

Unter den hier beschriebenen Bedingungen werden nur Nukleinsäuremoleküle, die länger als ca. 250 bp sind, quantitativ ausgefällt. Die Nukleinsäurelösung wurde auf 10% PEG, 0,5 NaCl eingestellt und 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde die Nukleinsäure durch 20-minütige Zentrifugation bei 6 000 rpm in einer Heraeus-Christ Minifuge GL sedimentiert. Der Überstand wurde möglichst vollständig abgezogen und Reste durch Invertieren der Röhrchen auf saugfähigem Papier entfernt. Das Sediment wurde einmal mit Ethanol gespült, für 5-10 min in Vakuum getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

3.11.2 Fällung mit Ethanol

Durch Ethanolfällung werden auch Fragmente, die kleiner als 250 bp sind, präzipitiert. Die Nukleinsäurelösung wurde auf 0,3 M NaOAc eingestellt und mit einem 2,5fachen Volumen an Ethanol versetzt. Nach dem Durchmischen wurde sie entweder für 1-2 min in flüssigem Stickstoff oder für 1 h bei -70°C eingefroren. Anschließend wurde die Nukleinsäure durch eine 15-minütige Zentrifugation entweder bei 6 000 rpm und 4°C in einer Heraeus-Christ Minifuge GL oder bei 12 000 rpm in einer Hettich-Zentrifuge sedimentiert. Das Sediment wurde einmal mit Ethanol gewaschen, für 5-10 min im Vakuum getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen.

3.12 Reaktionen mit DNA-modifizierenden Enzymen

3.12.1 Restriktionsverdauungen von DNA

Restriktionsverdauungen von DNA wurden in den von Maniatis et al. (1982) vorgeschlagenen Puffern durchgeführt. Für EcoRI wurde der vom Hersteller angegebene Puffer verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, zur Inaktivierung der Enzyme nach Ablauf der Reaktion wurden die Proben für 10 min auf 85°C erhitzt.

3.12.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Im typischen Fall wurden 100-200 ng Vektor-DNA mit einem 2-10fachen molaren Überschuß des zu insertierenden Fragments in einem Volumen von 10-20 µl inkubiert. Für die Ligation von überstehenden Einzelstrangenden wurden 0,2 U T4-DNA Ligase eingesetzt und die Inkubation 14 h bei 4°C durchgeführt. Zur Ligation von glatten Doppelstrangenden wurden 2 U T4-DNA-Ligase eingesetzt. In diesem Fall erfolgte die Inkubation 2-3 h bei Raumtemperatur.

T4-DNA-Ligasepuffer: 66 mM Tris-HCl, pH 7,6
6,6 mM $MgCl_2$
10 mM DTE
0,4 mM ATP

3.12.3 Auffüllen von einzelsträngigen 5' Enden der DNA

5' überstehende Einzelstrangenden von DNA-Restriktionsfragmenten wurden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus E.coli aufgefüllt.

Ein typischer Reaktionsansatz enthielt:

1 µg DNA
2 µl Nicktranslationspuffer 10x
2 µl einer 5 mM Stammlösung der vier Desoxiribonukleotidtriphosphate
1 U DNA-PolymeraseI (Klenow-Fragment)
ad 20 µl H_2O

Die Reaktion wurde für 1 h bei 16°C durchgeführt und anschließend durch 10-minütige Inkubation bei 85°C gestoppt. Die DNA wurde mit Ethanol gefällt und in Puffer aufgenommen.

Nicktranslationspuffer 10x: 500 mM Tris-HCl, pH 7,2
100 mM $MgSO_4$
1 mM DTT
500 µg/ml BSA

3.12.4 Desphosphorylierung von 5' Enden der DNA

Um die 5' Phosphatgruppen von DNA-Fragmenten zu entfernen, wurde die Alkalische Kälberdarmphosphatase verwendet. 10 pmol DNA wurden mit 0,1 U des Enzymes 1 h bei 45°C in TE-Puffer inkubiert. Anschließend

wurden nochmals 0,1 U zugegeben und die Inkubation für 1 h bei 45°C fortgesetzt. Die Phosphatase wurde nach Einstellen der Lösung auf 10 mM $MgCl_2$ durch 10-minütige Inkubation bei 90°C inaktiviert.

3.12.5 Phosphorylierung von einzelsträngigen 5' Enden der DNA

Um DNA Fragmente mit einer ^{32}P-markierten 5' Phospatgruppe zu versehen wurde das Enzym T4-Polynukleotidkinase verwendet. 10-20 pmol DNA-Fragment wurden in einem Volumen von 20-50 µl in Kinase-Puffer mit 5 U Polynukleotidkinase und 6 µl γ -^{32}P-ATP (9 000 Ci/mmol) für 30 min bei 37°C inkubiert.

Um die spezifische Aktivität der markierten DNA zu bestimmen wurden 1 µl des Ansatzes auf einen GF/A-Filter pipettiert und durch TCA-Fällung die markierte Nukleinsäure von der ungebundenen Radioaktivität getrennt. Dazu wurde der Filter je 1 min in 10% TCA, 5% TCA, Ethanol, Ethanol:Ether (1:1) und Ether gewaschen, unter der IR-Lampe getrocknet und im Szintillationszähler ausgezählt.

Der Reaktionsansatz wurde auf 0,3 M NaOAc eingestellt und mit 1 ml EtOH gefällt (Kap.3.11.2). Dazu wurden 10 µg tRNA als Fällungshilfe zugegeben.

Kinase-Puffer 10x:	400 mM Tris-HCl, pH 9,5
	200 mM $MgCl_2$
	1,0 mM EDTA

3.13 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die gelelektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren erfolgte in einer Agarose- oder in einer Polyacrylamid-Matrix. Die Wahl der jeweiligen Gelmatrix sowie der Konzentration an Polyacrylamid war von den Größen der aufzutrennenden Nukleinsäuren abhängig. Denaturierende Bedingungen wurden durch Zusatz von 8 M Harnstoff zu Polyacrylamidgelen und eine Temperatur von 55°C während der Elektrophorese erreicht.

3.13.1 Agarosegel-Elektrophorese

Um Fragmente von mehr als 1 000 bp Länge und ganze Plasmide aufzutrennen, wurden 1%ige Agarosegele verwendet. Es wurden entweder Horizontalgele der Abmessung 20x10x0,5 cm bzw. 7,2x4,8x0,5 cm oder Vertikalgele zwischen zwei Glasplatten mit der Abmessung 20x20x0,2 cm gegossen. Die Apparatur für die Vertikalgele wurde durch einen "Stopfen" aus 10 ml 8% Polyacrylamidmix abgedichtet. 70 ml 1%ige Agarose in TAE-Puffer (Kap. 3.2) wurde ca. 10 min im Mikrowellenherd erhitzt, um die Agarose zu schmelzen und nach Abkühlen auf etwa 50°C in die Apparaturen eingegossen. Die Auftragstaschen wurden durch Aufsetzen entsprechender Taschenschablonen ausgespart. Nach Erkalten der Agarose wurde die Taschenschablone entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer eingebaut und diese mit TAE-Puffer gefüllt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 30% Auftragspuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei Vertikalgelen bei 120-150 V, 70 mA, bei Horizontalgelen bei ca. 100 V, maximal 100 mA.

Auftragspuffer:	0,1% SDS
	0,1% Bromphenolblau
	0,1% Xylencyanolblau
	50 % Glycerin
	in TAE-Puffer

8% Polyacrylamidmix:	2 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)
	1 ml TEB 10x
	1 ml H_2O
	30 µl TEMED
	80 µl 10% APS

3.13.2 Polyacrylamidgel-Elektrophorese

3.13.2.1 Native Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Um DNA Fragmente von ca. 50-1000 bp Länge zu trennen, wurden native 5%ige Polyacrylamidgele benutzt. Es wurden Vertikalgele der Abmessung

20x20x0,2 cm und 20x20x0,1 cm verwendet. Zum Abdichten der Apparaturen wurden die Abstandshalter mit Vaseline eingefettet.

Zur Herstellung des Gels wurden folgende Lösungen pipettiert:

8,4 ml	40% Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)
7,0 ml	TEB 10x
7,0 ml	Glycerin
46,2 ml	H_2O
1,4 ml	10% APS
50 µl	TEMED

Die Aussparung der Auftragstaschen erfolgte durch Aufsetzen einer Taschenschablone.

Die Polymerisationszeit betrug 1-2 h. Nach Entfernen der Taschenschablone wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingebaut. Elektrophoresepuffer war 1 x TEB Puffer (Kap. 3.2). Die Proben wurden wie in Kap. 3.13.1 beschrieben behandelt. Die Elektorphorese erfolgte bei 0,2 cm Dicke bei 220 V und bei 0,1 cm Dicke bei 300 V.

3.13.2.2 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Zur Aufreinigung von Oligonukleotiden wurden 20%ige Polyacrylamidgele mit 8 M Harnstoff verwendet. Die Vertikalgele waren 20 cm breit, 40 cm hoch und 2 mm dick.

Folgende Komponenten wurden zusammengegeben:

75 g	Harnstoff
75 ml	40% Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)
15 ml	TEB 10x
ad 150 ml	mit H_2O

Nachdem der Harnstoff gelöst war, wurde die Lösung ca. 5 min im Exsikkator unter Rühren entgast. Nach Zugabe von 120 µl TEMED und 0,75 ml 10% APS wurde die Lösung in die Gelapparatur gegossen und die

Taschenschablone aufgesetzt.

Die Polymerisationszeit betrug 1-2 h. Anschließend wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingebaut, die Taschenschablone entfernt und die Taschen gründlich mit Puffer gespült. Es folgte eine Vorelektrophorese für 15-30 min bei 1000 V. Elektrophoresepuffer war 1 x TEB-Puffer (Kap. 3.2). Die Proben wurden in 100% Formamid aufgenommen und auf das Gel aufgetragen. In einer separaten Spur wurde Auftragspuffer (Kap. 3.13.1) mitelektrophoretisiert. Die Elektrophorese wurde bei 1000 V und 38 W für 5-6 Stunden durchgeführt.

3.14 Detektion von Nukleinsäuren in Elektrophoresegelen

3.14.1 Anfärben mit Ethidiumbromid

Diese Methode wurde zum Anfärben von Agarose- und Polyacrylamidgelen verwendet, wenn die DNA-Menge pro Bande größer als 10 ng war. Die Gele wurden 10 min in einer 0,001%igen Ethidiumbromidlösung gefärbt und 10 min in Wasser entfärbt. Anschließend wurden die Gele im durchscheinenden UV-Licht (302 nm) fotographiert, wobei ein Orangerot-Filter verwendet wurde.

3.14.2 Anfärben mit Silber

Polyacrylamidgele einer Dicke von 1 mm wurden mit dieser Methode angefärbt, wenn die DNA-Menge pro Bande weniger als 10 ng betrug. Die Gele wurden 10 min in einer Lösung aus 10% Ethanol und 0,5% Eisessig fixiert. Anschließend wurden sie 30 min in einer Silbernitratlösung (1,9 g/l H_2O) gefärbt und 4 x 10 sec mit destilliertem Wasser gespült. Die Entwicklung erfolgte für 10 min in Entwicklerlösung. Die entwickelten Gele wurden für 10 min in Natriumcarbonatlösung (7,5 g/l) fixiert. Anschließend wurden die Gele im durchscheinenden Licht fotographiert.

Entwicklerlösung: 15 g/l NaOH
85 mg/l $NaBH_4$
3,75 ml/l 40% Formaldehyd

Die Entwicklerlösung wurde immer frisch angesetzt, die Silbernitratlösung konnte mehrfach verwendet werden.

3.14.3 Detektion durch Fluoreszenz-Schattierung

Diese Methode wurde verwendet, um Oligonukleotide in präparativen Polyacrylamid-Harnstoff-Gelen zu detektieren. Das Gel wurde in Klarsichtfolie gepackt, auf eine Dünnschichtplatte mit Fluoreszenzindikator gelegt und von oben mit UV-Licht (302 nm) betrahlt. Durch die Absorption der DNA bleiben die Stellen, an denen sich die Oligonukleotide befinden, dunkel gegen einen fluoreszierenden Hintergrund. Die Banden wurden mit Filzstift auf der Klarsichtfolie markiert und anschließend ausgeschnitten.

3.14.4 Autoradiographie

Radioaktiv markierte DNA-Fragmente wurden durch Autoradiographie nachgewiesen. Die Polyacrylamidgele wurden auf einer Glasplatte belassen und mit Klarsichtfolie bedeckt. Die Position der Farbmarker wurde mit radioaktiver Tinte markiert. Die Gele wurden in Exponier-Boxen mit Röntgenfilmen (Kodak X-omat AR) und einer Verstärkerfolie belegt und im Dunkeln exponiert. Sollte die Nukleinsäure aus dem Gel eluiert werden (Kap. 3.15), wurde bei Raumtemperatur für 10-15 min exponiert. Eine Bande mit der Aktivität 5 x 10^6 cpm wurde unter diesen Bedingungen nach ca. 2 min. sichtbar. Für analytische Zwecke wurden die Gele bei -70°C eingefroren. Unter diesen Bedingungen war eine Bande mit der Aktivität von 15 000 cpm nach ca. einer Stunde sichtbar. Sequenziergele wurden bei -70°C je nach der Menge an aufgetragener Radioaktivität 14 h - 2 Wochen exponiert. Die Filme wurden nach Angaben des Herstellers entwickelt.

3.15 Elution von Nukleinsäuren aus Elektrophoresegelen

Diese Methode wurde verwendet, um einzelne Restriktionsfragmente zu isolieren. Fragmente, die kleiner als 1000 bp waren, wurden aus Polyacrylamidgelen eluiert, während größere Fragmente und Vektoren, die von ausgeschnittenen Fragmenten getrennt werden sollten, aus Agarosegelen eluiert wurden.

3.15.1 Elution aus Polyacrylamidgelen

Um DNA-Fragmente aus Polyacrylamidgelen zu isolieren, wurde die Elektrophorese wie in Kap. 3.13 beschrieben durchgeführt und die Gele anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt (Kap. 3.14.1).

Die entsprechende Bande wurde mit einem ausgeglühten Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Das Gelstück wurde mit einer sterilen 600 µl-Kunststoff-Spritze zerstampft. Nach Zugabe von 1 ml Elutionspuffer wurde die Gelmasse durch Schütteln auf einem Vortex-Rührer möglichst homogen suspendiert und die Probe für 1 h bei 65°C inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 12 000 rpm in einer Hettichzentrifuge wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, 1 ml Elutionspuffer zum Sediment gegeben, die Probe auf einen Vortex-Rührer durchmischt und erneut 1 h bei 65°C inkubiert. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation bei 12 000 rpm wurden die Überstände vereinigt. Die Nukleinsäure wurde durch Chromatographie an DE52 aufgereinigt (Kap. 3.26). Das Säuleneluat wurde mit 1 ml Ethanol versetzt, die Probe durchmischt, für 2 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend 10 min bei 12 000 rpm in einer Hettichzentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 1 ml absolutem Ethanol gespült und für 5 min in Vakuum getrocknet. Die DNA wurde in 10 µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

Elutionspuffer:

500 mM NH_4OAc
20 mM MgOAc
1 mM EDTA
0,1% SDS

3.15.2 Elution aus Agarosegelen

Ganze Plasmide oder Fragmente die größer als 1000 bp waren, wurden aus 1%igen Agarosegelen eluiert. Hierzu wurden horizontale Gele verwendet, denen Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt wurde.

Die Elektrophorese wurde wie in Kap. 3.13 beschrieben durchgeführt. Das Gel wurde auf einen UV-Leuchtschirm gelegt, und die zu eluierenden DNA-Banden wurden ausgeschnitten. Außerdem wurde daran anschließend ein ca. 2 cm langer Streifen zwischen Bande und Anode ausgeschnitten. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer zurückgelegt und die Lücken wurden so mit Dialyseschlauch ausgelegt, daß es zu keinem Pufferaustausch innerhalb und außerhalb des Dialyseschlauches kommen konnte. Dann wurde das Gelstück, das die zu eluierende DNA enthielt, wieder an seinen ursprünglichen Platz gebracht und die Lücken wurden mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt. In die Apparatur wurde soviel Elektrophoresepufer eingefüllt, daß das Gel knapp bedeckt war. Es wurde für 30 min eine Spannung von 200 V angelegt. In dieser Zeit wanderte die DNA aus dem Gelstück in den puffergefüllten Raum innerhalb des Dialyseschlauches. Anschließend wurde für 60 sec die Spannung umgepolt, um die DNA vom Dialyseschlauch zu entfernen. Der Puffer innerhalb des Dialyseschlauches wurde in ein Röhrchen überführt und die Vollständigkeit der Elution wurde durch Beleuchten des Gelstückes mit UV-Licht überprüft.

Die Lösung wurde im Vakuum zur Trockne eingeengt und das Sediment in 200 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Lösung wurde zweimal mit Phenol (Kap. 3.2) und zweimal mit Diethylether extrahiert. Anschließend wurden eine PEG-Fällung (Kap. 3.11.1) und eine Ethanol-Fällung (Kap. 3.11.2) durchgeführt und die DNA in 20-50 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Ausbeute wurde durch Elektrophorese eines Aliquots auf einem 1%igen Agarosegel überprüft.

3.16 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung wurde nach der Dideoxi-Methode von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Das zu sequenzierende DNA-Fragment mußte hierzu als Insertion in einem M13-Vektor vorliegen. Die einzelsträngige M13-DNA wurde präpariert (Kap. 3.8.2). Im typischen Fall wurden 4 µl einer Einzelstrang-DNA Präparation zur Sequenzierung eingesetzt. Dies entsprach einer Menge von ca. 0,5-2 µg DNA.

Hybridisierung des Sequenzierprimers an die M13-Einzelstrang-DNA

Der Hybridisierungsansatz enthielt folgende Komponenten:

4,0 µl M13 Einzelstrang-DNA (0,5-2 µg)
1,5 µl Klenow-Puffer 10x
1,0 µl Sequenzierprimer (2,5 µg/ml)
4,0 µl H_2O

Der Ansatz wurde für 30 min in einem Trockenofen auf 65°C erwärmt und anschließend innerhalb von 1-2 Stunden auf Raumtemperatur abgekühlt.

Klenow-Puffer 10x: 100 mM Tris-HCl, pH 8,0
50 mM $MgCl_2$

Sequenzierreaktion

Zum Hybridisierungsansatz wurden 1 µl α -^{32}P-dATP (10 µCi/µl, 400 Ci/mmol) und 2 µl DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) (1U/µl) zugegeben und der Ansatz durch Auf- und Abpipettieren durchmischt. Anschließend wurden je 2,5 µl des Ansatzes in 4 Eppendorfgefäße, die mit G, A, T und C beschriftet worden waren, pipettiert. Die Eppendorfgefäße wurden offen in eine Hettichzentrifuge eingesetzt und folgende Komponenten an die Wand der Gefäße pipettiert:

3 µl Ğ + ddGTP-Gemisch in Gefäß G
3 µl Å + ddATP-Gemisch in Gefäß A
3 µl Ť + ddTTP-Gemisch in Gefäß T
3 µl Č + ddCTP-Gemisch in Gefäß C

Die Reaktion wurde durch kurzes Anzentrifugieren gestartet und die Ansätze für 15 min bei 30°C inkubiert.

Anschließend wurden die Reaktionsgefäße wieder in die Zentrifuge eingesetzt, je 3 µl Verlängerungs-Lösung an die Wand aller Gefäße pipettiert, kurz anzentrifugiert und erneut 15 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 10 µl Formamid-Auftragslösung I gestoppt. Je 3 µl wurden entnommen, vor dem Auftragen auf das Sequenziergel (Kap. 3.18) 3 min bei 95°C erhitzt und sofort auf Eiswasser abgekühlt.
Die restlichen Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

Formamid-Auftragslösung I: 96 % Formamid
0,1% Bromphenolblau
0,1% Xylencyanolblau
4 % 0,5 M EDTA

dNTP-Gemische (N̊):

	Å	C̊	G̊	T̊
0,5 mM dCTP	20 µl	1 µl	20 µl	20 µl
0,5 mM dGTP	20 µl	20 µl	1 µl	20 µl
0,5 mM dTTP	20 µl	20 µl	20 µl	1 µl
1 x TE-Puffer	20 µl	20 µl	20 µl	20 µl

ddNTP-Lösung: 10 mM ddNTP

dNTP/ddNTP-Gemisch
(N̊ + ddNTP): Å : ddATP = 40 : 1
C̊ : ddCTP = 20 : 1
G̊ : ddGTP = 10 : 1
T̊ : ddTTP = 10 : 1

Verlängerungslösung: 0,5 mM dATP
0,5 mM dCTP
0,5 mM dGTP
0,5 mM dTTP

3.17 DNaseI-Schutzexperimente

Mit dieser Methode wurde die sequenzspezifische Bindung eines Proteins an DNA detektiert, um die räumliche Ausdehnung des gebundenen Proteins auf der DNA und die Affinität einzelner Bindestellen zu untersuchen (Galas und Schmitz, 1978). Ein an einem Ende radioaktiv markiertes DNA-Fragment wurde mit und ohne Protein einer limitierten Spaltung mit DNaseI unterworfen. Die entstandenen Fragmente wurden durch denaturierende Gelelektrophorese (Kap. 3.13.2) aufgetrennt und das Bandenmuster durch Autoradiographie (Kap. 3.14.4) detektiert. Durch Vergleich mit einer parallel dazu durchgeführten purinspezifischen Sequenzierreaktion (Maxam und Gilbert, 1980) konnten vor der DNaseI-Spaltung geschützte Bereiche der DNA identifiziert werden.

3.17.1 Vorbereitung der DNA

Das zu untersuchende DNA-Fragment wurde dephosphoryliert (Kap. 3.12.4) und durch anschließende Phosphorylierung mit γ-^{32}P-ATP radioaktiv markiert (Kap. 3.12.5). Durch Verdauung mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease (Kap. 3.12.1) wurde das Fragment in zwei Subfragmente gespalten, die jeweils an einem Ende radioaktiv markiert waren. Durch Elution aus einem 5%igen Polyacrylamidgel (Kap. 3.15.1) wurde das Fragment, auf dem die Proteinbindestellen lokalisiert waren, isoliert.

3.17.2 DNaseI-Reaktion

DNaseI (Boehringer, GradI) wurde als Stammlösung in H_2O (200 µg/ml) in Aliquots à 30 µl bei -20°C aufbewahrt. Die Reaktionsansätze erfolgten in einem Gesamtvolumen von 100 µl in DNaseI-Puffer. Je 0,1-0,2 pmol DNA wurden mit entsprechenden Mengen an Protein für 15 min bei 37°C in DNaseI-Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DNaseI gestartet. Nach 30 sec Inkubation bei Raumtemperatur wurden 1 ml Ethanol mit 0,1 M Natriumacetat und 2 µg/ml tRNA (2 mg/ml Stamm-

lösung) zugegeben die Proben durchmischt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die DNA wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 12 000 rpm sedimentiert, mit 1 ml Ethanol gespült und für 5 min im Vakuum getrocknet. Die Proben wurden in 3 µl Formamid-Auftragslösung II gelöst, 3 min bei 95°C erhitzt, sofort in Eiswasser abgekühlt und auf ein Sequenziergel (Kap. 3.18) aufgetragen.

Die optimale Menge an DNaseI wurde für jede DNA empirisch bestimmt. Als Richtwert können 5-10 ng DNaseI für 0,1-0,2 pmol eines 100-200 bp langen DNA-Fragments gelten.

DNaseI Puffer 10x:	100 mM Natriumcacodylat, pH 8,0
	100 mM $MgCl_2$
	50 mM $CaCl_2$
	1 mM DTT
Formamid-Auftragslösung II:	98 % Formamid
	0,1% Bromphenolblau
	0,1% Xylencyanolblau
	2 % H_2O

3.17.3 Purinspezifische Spaltung nach Maxam und Gilbert

Um die geschützten Bereiche einem bestimmten Abschnitt der Sequenz des DNA-Fragments zuordnen zu können, wurde die G+A-spezifische Sequenzierreaktion nach Maxam und Gilbert (1980) durchgeführt. Die Reagenzien hierzu wurden aus dem "DNA Sequencing Kit NEK-010" von NEN, Dreieich verwendet. Als Träger-DNA diente ultraschalldegradierte Plasmid-DNA (pVH51, 1 mg/ml).

Folgende Komponenten wurden pipettiert:

10 µl ^{32}P-markierte DNA (0,1-0,2 pMol)
1 µl Träger-DNA
1 µl Glycogen (10 mg/ml)

10 µl H_2O
3 µl 1 M Piperidiniumformiat

Nach Zugabe des Piperidiniumformiats wurde 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und 1 h lyophylisiert, in 20 µl H_2O gelöst und nochmals 1 h lyophylisiert. Das Sediment wurde in 50 µl 1 M Piperidin gelöst und 30 min bei 90°C in einem Heizblock inkubiert, wobei die Deckel der Eppendorf-Gefäße gegen Aufspringen gesichtert wurden.

In neue Eppendorf-Gefäße wurden folgende Komponenten vorgelegt:

50 µl 0,3 M NaOAc
1 µl Glycogen (10 mg/ml)
400 µl Ethanol

Die Ansätze wurden nach Ablauf der 30 min hinzupipettiert, gemischt, die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und 10 min in einer Hettich-Zentrifuge bei 12 000 rpm zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 1 ml Ethanol gespült, 5 min im Vakuum getrocknet, in 20 µl H_2O aufgenommen und über Nacht lyophylisiert. Anschießend wurden die Proben in 3 µl Formamid-Auftragslösung II gelöst, 3 min bei 95°C erhitzt, in Eiswasser abgekühlt und mit den Proben der DNaseI-Reaktion auf ein Sequenziergel aufgetragen.

Formamid-
Auftragslösung II: 98 % Formamid
0,1% Bromphenolblau
0,1% Xylencyanolblau
2 % H_2O

3.18 Sequenziergele

Sequenziergele waren 8%ige Polyacrylamidgele mit 8 M Harnstoff mit einer Abmessung von 520x200x0,2 mm. Zur Herstellung der Sequenziergele

und zur Elektrophorese wurden eine LKB 1010-100 Macromould-Gießapparatur sowie eine LKB 2010-001 Makrophor-Elektrophoreseapparatur verwendet. Die Handhabung der einzelnen Komponenten erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Thermostatisierplatten wurden vor jeder Benutzung mit Dichlordimethylsilan silanisiert. Hierzu wurden 10 ml einer 5%igen Lösung von Dichlordimethylsilan in Choroform auf der gereinigten Glasplatte verteilt und 10-15 min antrocknen lassen. Anschließend wurde die Platte mit Ethanol abgerieben und mit Kleenex-Tüchern poliert.

Zur Herstellung des Gels wurden folgende Komponenten zusammengegeben:

29,4 g Harnstoff
14,0 ml 40% Acrylamid/Bisacrylamid (19:1)
7,0 ml TEB-Puffer 10x
ad 70 ml H_2O

Der Harnstoff wurde unter Rühren gelöst, die Lösung zur Entfernung von Partikeln durch einen Faltenfilter filtriert und anschließend unter Rühren für 5 min in einem Vakuum-Exsikkator entgast.

Zum Starten der Polymerisation wurden 420 µl 10% APS und 70 µl TEMED zugegeben und das Gel nach Angaben des Herstellers "geschoben". Nach einer Polymerisationszeit von mindestens einer Stunde wurde das Gel in die Elektrophoreseapparatur eingebaut. Vor dem Auftragen der Proben wurde eine Vorelektrophorese von 30-60 min bei 2500 V und 55°C durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte in TEB-Puffer (Kap. 3.2).

Die Proben wurden mit Hilfe einer ausgezogenen Glaskapillare aufgetragen, wobei darauf zu achten war, daß die Taschen kurz vor dem Auftragen gründlich ausgespült waren. Die Elektrophorese erfolgte bei 3000 V und 55°C.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Apparatur ausgebaut und die Thermostatisierplatte vom Gel, das auf der zweiten Platte verblieb, abgehoben. Das Gel wurde wie in Kap. 3.14.4 beschrieben für die Autoradiographie vorbereitet.

3.19 Bindung von Protein-DNA Komplexen an Nitrocellulose-Filter

Diese Methode wurde verwendet um die Konzentration an Protein-Nukleinsäure-Komplexen in einer Lösung zu bestimmen (Hillen et al., 1983). Sie beruht auf der Tatsache, daß Proteine und Protein-Nukleinsäure-Komplexe unter bestimmten Bedingungen an Nitrocellulose binden, freie Nukleinsäure dagegen nicht, oder nur in geringem Maße. Sind die Nukleinsäuren radioaktiv markiert, so ist die Menge an gebundener Radioaktivität ein Maß für die Konzentration an Protein-Nukleinsäure-Komplexen.

Nitrocellulosefilter wurden für mindestens 30 min im verwendeten Reaktionspuffer eingeweicht. Die Filter wurden in eine Absaug-Vorrichtung eingespannt. 50 µl Probenvolumen wurde aufgegeben, mit einem schwachen Wasserstrahlpumpen-Vakuum abgesaugt, anschließend wurden zweimal 300 µl des Reaktionspuffers aufgegeben und abgesaugt, um freie Nukleinsäure vom Filter zu waschen. Die Filter wurden unter einer IR-Lampe getrocknet und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt (Kap. 3.28). Es wurden Schleicher und Schuell BA85-Nitrocellulosefilter mit einer Porengröße von 0,45 µm verwendet.

3.20 Messung der Dissoziationsgeschwindigkeit von Protein-DNA Komplexen

Die Geschwindigkeit der Dissoziation von Protein-Nukleinsäure-Komplexen wurde mit Hilfe der Bindung an Nitrocellulosefilter (Kap. 3.19) bestimmt. Die DNA-Fragmente wurden durch Phosphorylierung mit γ-^{32}P-ATP (Kap. 3.12.5) radioaktiv markiert. Das überschüssige γ-^{32}P-ATP wurde durch eine G50-Säulenchromatographie (Kap. 3.25) abgetrennt. Die radioaktive DNA wurde in einer Konzentration von 1×10^{-9} M mit einem 5fachen molaren Überschuß an Protein in einem Gesamtvolumen von 1 ml in lac-Puffer 15 min bei 37°C inkubiert. Zum Zeitpunkt t=0 wurde ein 50-100facher molarer Überschuß an unmarkiertem DNA-Fragment zugegeben, sofort 50 µl entnommen und die proteinassoziierte Radioaktivität durch Bindung an Nitrocellulosefilter (Kap. 3.19) bestimmt. Die Inkubation bei 37°C wurde fortgesetzt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden weitere

50 µl-Proben entnommen und analysiert. Die unspezifische Retention von DNA an die Filter wurde durch eine Probe bestimmt, die alle Komponenten des Reaktionsansatzes mit Ausnahme des Proteins enthielt. Die gebundene Radioaktivität dieser Probe wurde von allen anderen Werten abgezogen.

In einem Parallelansatz wurde der Protein-Nukleinsäure Komplex ohne Zugabe von unmarkierter DNA inkubiert. Proben hieraus wurden zu Beginn und am Ende der Inkubationszeit entnommen, um einen Verlust an gebundener Radioaktivität durch andere Ursachen als die Dissoziation der Komplexe auszuschließen.

lac-Puffer 1x:	10 mM Tris-HCl, pH 7,4
	10 mM KCl
	10 mM $MgCl_2$
	1 mM DTT
	0,1 mM EDTA
	50 µg/ml BSA

3.21 Synthese von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden entweder mit einem Applied-Biosystems 380A-DNA-Synthesizer oder von Hand nach der Phosphoamidit-Methode (Winnacker und Dörper, 1982) synthetisiert. Bei Verwendung der Phosphoamidit-Methode wurden je 2 µmol an Silicagel gekoppeltes Startnukleotid und je 3 µmol der Desoxinukleosid-Phosphoamidite eingesetzt. Die Syntheseschritte wurden in einer Pyrex No 36060 Glasfaserfritte durchgeführt. Vakuum wurde durch eine Wasserstrahlpumpe angelegt.

Der Synthesezyklus ist im folgenden schematisch dargestellt:

Detritylierung:	- 2 x 2 min mit 3% TCA in CH_2Cl_2 inkubieren, absaugen
Spülen:	- 3-5 ml CH_3NO_2, absaugen
	- 3-5 ml CH_3OH, absaugen
	- 3-5 ml CH_3CN, absaugen

	- Fritte mit CH_3CN füllen
Kondensation:	- 3 µmol Phosphoamidit in 300 µl 0,5 M Tetrazol in Azetonitril lösen
	- Argonatmosphäre an Fritte anlegen
	- CH_3CN absaugen
	- Phosphoamiditlösung mit Spritze aufbringen
	- 5 min unter Argon inkubieren
	- absaugen
Capping:	- 1,5 ml Capping-Lösung aufgeben
	- 2 min inkubieren, absaugen
Spülen:	- 1 ml THF, absaugen
Oxidation:	- 1,5 ml 0,2 M Jod-Lösung in THF:H_2O:Lutidin = 2:2:1
	- 2 min inkubieren, absaugen
Spülen:	- 2 ml THF, absaugen
	- 2 ml CH_3Cl_2, absaugen

Beginn des 2. Zyklus mit Detritylierung

Nach der letzten Kopplung wurde nicht detrityliert, abschließend wurde mit 2 ml Ether gespült und das Gel trockengesaugt.

Capping-Lösung:	2 Teile 65 mg/ml DMAP in THF
	1 Teil Essigsäureanhydrid:Lutidin = 1:1

Abspaltung der Schutzgruppen

Zur Abspaltung der Methylgruppen der Phosphotriester wurde das Gel für 45 min in 2 ml Thiophenol:Triethylamin:Dioxan (1:1:2 v/v) inkubiert und anschließend mit 5 ml Dioxan, 5 ml THF, 10 ml CH_3OH, 5 ml THF und 5 ml Ether gespült.

Das Gel wurde in ein 5 ml-Schraubkappenröhrchen überführt und zur Abspaltung der Syntheseprodukte vom Träger sowie der Schutzgruppen der Basen in 3 ml 25%iger Ammoniaklösung für 14 h bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand am Rotationsverdampfer bei 37°C zur Trockne eingeengt. Das Sediment wurde in 1 ml 1 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA aufgenommen und konnte in diese Form zur Aufreinigung durch HPLC verwendet werden (Kap. 3.22.1).

Reinheitsgrad der verwendeten Reagenzien

Tetrahydrofuran (THF)	p.a.	getrocknet über Aluminiumoxid
CH_2Cl_2	p.a.	- " -
Methanol	p.a.	- " -
CH_3NO_3	p.a.	- " -
Dioxan	p.a.	- " -
Triethylamin	p.a.	destilliert über KOH
Acetonitril	p.a.	destilliert über CaH_2
Trichloressigsäure (TCA)	p.a.	
Jod	p.a.	
Lutidin	p.a.	
Dimethylaminopyridin (DMAP)	p.a.	
Essigsäureanhydrid (Ac_2O)	p.a.	
Tetrazol	p.a.	2 x sublimiert
Thiophenol	p.a.	

Diisopropylamidite und Starter-Gel der Firma Applied Biosystems

3.22 Aufreinigung der synthetisierten Oligonukleotide

3.22.1 Aufreinigung durch HPLC

Die von Hand synthetisierten Oligonukleotide wurden durch HPLC aufgereinigt. Nach Abspaltung der Schutzgruppen (Kap. 3.21) verblieb am Ende der Synthese noch die Tritylgruppe am längsten Syntheseprodukt. Dieses wurde durch reversed phase HPLC von den untritylierten, kürzeren Syntheseprodukten getrennt. Es wurde eine mit C18-Material gefüllte Säule verwendet. Maximal die 10 A_{260}-Einheiten entsprechende Menge an Syntheseprodukt wurde für einen Lauf aufgetragen. Zunächst wurde 5 min mit 20% Acetonitril in 0,1 M Triethylammoniumacetat (TEAA) eluiert, dann ein linearer Gradient angelegt, bei dem die Acetonitrilkonzentration innerhalb von 30 min auf 30% anstieg und abschließend 10 min bei 30% Acetonitril, 0,1 M TEAA eluiert. Die Flußrate betrug 1,5 cm^3/min, die Detektion der Nukleinsäure erfolgte durch Messung der UV-Absorption bei 260 nm. Das tritylierte Oligonukleotid eluiert unter diesen Bedingungen bei einer Acetonitrilkonzentration von 25-30%. An-

schließend wurde die Produktfraktion im Rotationsverdampfer bei Raumtemperatur zur Trockne eingeengt und das Sediment in 500 µl 80%iger Essigsäure aufgenommen. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe erneut bei Raumtemperatur zur Trockne eingeengt und für weitere 10 min im Vakuum getrocknet. Das Sediment wurde in 500 µl H_2O aufgenommen und durch erneute HPLC weiter aufgereinigt. Zunächst wurde 5 min bei 10% Acetonitril in 0,1 M TEAA eluiert, dann innerhalb von 20 min ein linearer Gradient von 10% auf 20% Acetonitril angelegt und weitere 10 min bei 30% Acetonitril, 0,1 M TEAA eluiert. Die Flußrate betrug 1,0 cm^3/min. Die Produktfraktion wurde zur Trockne eingeengt und das Sediment in 50 µl H_2O aufgenommen, erneut zur Trockne eingeengt und in 500 µl 1 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA aufgenommen. Die Ausbeute wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt.

3.22.2 Aufreinigung durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Nach dieser Methode wurden die maschinell synthetisierten Oligonukleotide aufgereinigt. Das Endprodukt der Synthese (ca. 1 ml Lösung) wurde mit 1,5 ml 25%iger Ammoniaklösung versetzt und 6-10 h bei 55°C inkubiert. Je 0,5 ml der Probe wurden mit 0,5 ml H_2O in ein Eppendorf-Gefäß überführt, auf einem Vortex-Rührer gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden an einem Savant Speed-Vac Concentrator zur Trockne lyophylisiert. Die Sedimente wurden in 0,5 ml 80%iger Essigsäure aufgenommen, 15 min bei Raumtemperatur unter häufigem Schütteln auf einem Vortex-Rührer inkubiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophylisiert. Die Sedimente wurden in 0,5 ml 20 mM Ammoniumacetatlösung pH 5,4 gelöst. Anschließend wurden die Proben dreimal mit je 1 ml Ether extrahiert und 10 min bei 12 000 rpm in einer Hettich-Zentrifuge zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Eppendorf-Gefäße überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und lyophylisiert. Die Sedimente wurden in 100 µl Formamid gelöst, auf ein denaturierendes 20%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisiert (3.13.2). Die Banden wurden durch Fluoreszenz-Schattierung (Kap. 3.14.3) detektiert, und die Bande, die dem längsten Syntheseprodukt entsprach, wurde mit einem ausgeglühten Skalpell ausge-

schnitten und in ein 10 ml Röhrchen überführt.

Die Gelstücke wurden mit einem sterilen Glasstab zerkleinert und in 3 ml TE-Puffer aufgenommen. Nach Durchmischung auf einem Vortex-Rührer wurden die Proben für 3-4 h bei 55°C inkubiert. Das Gel wurde durch 5-minütige Zentrifugation bei 6 000 rpm in einer Heraeus-Christ Minifuge GL sedimentiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und das Sediment erneut in 3 ml TE-Puffer suspendiert und für einige Stunden bei 55°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Überstände zusammengefaßt und eine DE-52 Säulenchromatographie durchgeführt (Kap. 3.26). Nach Zugabe von 1 ml Ethanol zum Eluat wurde die Probe durchmischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die DNA wurde durch 10-minütige Zentrifugation bei 12 000 rpm in einer Hettich-Zentrifuge sedimentiert. Zum Sediment wurden 0,5 ml Ethanol gegeben, die Probe wurde erneut in flüssigem Stickstoff eingefroren und 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde für 5 min im Vakuum getrocknet und in 500 µl TE-Puffer aufgenommen. Die Ausbeute wurde durch Messung der UV-Absorption bestimmt.

3.23 Hybridisierung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide, die zur Klonierung verwendet wurden, wurden nach der Aufreingigung zu Doppelsträngen hybridisiert. Hierzu wurden je 20 pmol Oligonukleotide in Ligase-Puffer auf 65°C erwärmt und im Verlauf von 1-2 Stunden im Wasserbad auf Raumtemperatur abgekühlt.

Ligase-Puffer:
50 mM Tris-HCl, pH 7,6
10 mM $MgCl_2$
10 mM DTT
1 mM ATP

3.24 Gerichtete Mutagenese

Die gerichtete Mutagenese mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide wurde nach der Methode von Kramer et al. (1984) durchgeführt. Zur Kon-

struktion der gapped-duplex DNA (gdDNA) wurde die RF-DNA (Kap. 3.8.3) von M13 mp9rev mit BamHI linearisiert.

0,5 µg des linearisierten M13 mp9rev wurden mit 1,25 µg einzelsträngiger DNA des zu mutierenden M13 mp9-Derivats (Kap. 3.8.2) in einem Endvolumen von 40 µl 187,5 mM KCl, 12,5 mM Tris-HCl, pH 7,5 gemischt. Der Reaktionsansatz wurde für 5 min auf 100°C und anschließend für 10 min bei 65°C inkubiert

5 µl des Ansatzes wurden auf einem 1%igen Agarosegel (Kap. 3.13.1) analysiert. Als Markersubstanz wurden 0,2 µg einzelsträngige M13 mp9 DNA, 0,2 µg M13 mp9 RF-DNA und 0,2 µg linearisierte M13 mp9 DNA aufgetragen.

Die gdDNA wurde anschließend durch Elution aus einem 1%igen Agarosegel isoliert (Kap. 3.15.2). Die Oligonukleotide wurden durch Gelelution aufgereinigt (Kap. 3.22.2) und anschließend phosphoryliert (Kap. 3.12.5). Zur Hybridisierung der Oligonukleotide an die gdDNA wurden 10 pMol Oligonukleotide mit 0,1 pMol gdDNA gemischt, die Ansätze 45 min auf 65°C erwärmt und anschließend im Verlauf von ca. 2 h auf Raumtemperatur abgekühlt.

Zur Auffüllreaktion wurden folgende Komponenten zusammengegeben:

ca. 20 µl	Hybridisieransatz (gdDNA + Oligonukleotid)
4 µl	625 mM HCl
	275 mM Tris-HCl, pH 7,5
	150 mM $MgCl_2$
	20 mM DTT
	0,50 mM ATP
4 µl	0,25 mM je dNTP
4 U	T4 DNA-Ligase
0,4 U	DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment)
ad 40 µl	mit H_2O

Der Ansatz wurde 25 min bei 25°C inkubiert. Nach Zusatz von 260 µl TE-Puffer und 150 µl 30% PEG, 1,5 M NaCl wurde eine PEG-Fällung durchgeführt (Kap. 3.11.1). Das Sediment wurde mit 200 µl Ethanol gespült, 2 min im Vakuum getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Dieser

Ansatz wurde zur Transformation von E.coli BMH71-18 mut S (Kap 3.3) eingesetzt. 200 µl kompetente E.coli BMH71-18 mut S Zellen (Kap. 3.5.1) wurden mit dem Ansatz gemischt und 90 min auf Eis inkubiert. Nach einer 3 minütigen Inkubation bei 42°C wurden 20 µl des Ansatzes ausplattiert (Kap. 3.8.4), um die Transformationsrate zu bestimmen.

20 ml LB-Medium wurden mit dem restlichen Transformationsansatz angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und der Phagenüberstand durch 10 minütige Zentrifugation bei 6000 rpm und 4°C gewonnen. Der Phagenüberstand wurde in Stufen von 10^{-2} bis 10^{-8} in 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA verdünnt und auf E.coli MK30-3 (Kap. 3.3) ausplattiert.
Hierzu wurden folgende Komponenten gemischt:

3 ml Weich-Agar, 45°C
200 µl MK30-3, logarithmisch wachsende Zellen
100 µl Phagenüberstand bzw. Verdünnung
50 µl 2% X-Gal in DMF
10 µl 100 mM IPTG

und auf LB-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.25 G50-Säulenchromatographie

Radioaktiv 5'-phosphorylierte Nukleinsäure (Kap. 3.12.5) wurde von überschüssigem γ-^{32}P-ATP durch Chromatographie an G50-Material abgetrennt. Eine Säule mit 6 mm Durchmesser und 100 mm Höhe wurde in einer Pasteur-Pipette hergestellt und mit TE-Puffer äquilibriert. Die Probe wurde in einem Volumen von 50 µl auf die Säule aufgetragen und mit TE-Puffer eluiert. Fraktionen à 300 µl wurden gesammelt und die Radioaktivität durch Messung der Cerencov-Strahlung (Kap. 3.28) bestimmt. Die Fraktionen des ersten Peaks (Nukleinsäure) wurden zusammengefaßt und die DNA mit Ethanol gefällt (Kap. 3.11.2).

3.26 DE52-Säulenchromatographie

Aus Polyacrylamidgelen eluierte Nukleinsäuren wurden durch Chromatographie an DE52 Material aufgereinigt. Hierzu wurde eine 1 ml-Kunststoffspritze verwendet, deren Auslauf mit silikonisierter Glaswolle verstopft worden war. Die Spritze wurde mit ca. 200 µl in TE suspendiertem DE52-Material gefüllt und mit 2 ml TE-Puffer äquilibriert. Nach Auftragen der Nukleinsäurelösung wurde mit 2 ml TE-Puffer nachgewaschen. Die DNA wurde mit 400 µl 2 M NaCl in TE-Puffer von der Säule eluiert.

3.27 CsCl-Dichtegradientenzentrifugation

Um die superhelikale Form von Plasmiden und M13-Derivaten von Resten chromosomaler DNA, Einzelstrang-DNA sowie offen- ringförmigen Plasmidmolekülen zu trennen, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation in CsCl durchgeführt.

Die DNA wurde in 1,7 ml TE-Puffer gelöst und mit 1,9 g CsCl und 100 µl Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml in H_2O) versetzt. Die Lösung wurde in Quick-Seal-Röhrchen (Beckman 13x51 mm) gefüllt und die Röhrchen wurden anschließend mit Auffüllösung vollständig aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte in einem Beckman VTi 65-Vertikalrotor für 14 h bei 55 000 rpm und 15°C.

Die der superhelikalen DNA entsprechende Bande wurde unter UV-Licht detektiert und mit einer Spritze abgezogen. Die Lösung wurde 2-3 mal häufiger mit H_2O-gesättigtem Butanol extrahiert, als notwendig war, um eine farblose wässrige Phase zu erhalten. Anschließend wurde die Lösung 3 mal 8 h gegen je 2 l TE-Puffer dialysiert. Nach der Dialyse wurden eine PEG-Fällung durchgeführt (Kap. 3.11.1), das Sediment in TE-Puffer aufgenommen und die Nukleinsäurekonzentration durch Messung der UV-Absorption (Kap. 3.29) bestimmt.

Auffüllösung: 103 g CsCl
100 ml TE-Puffer
3 ml Ethidiumbromidlösung (5 mg/ml in H_2O)

3.28 Radioaktivitätsmessung

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden Filter in Szintillationsgläschen überführt und mit Szintillationsflüssigkeit überschichtet. Die Zählung erfolgte in einem Packard Tricarb L 2425 Szintillationszähler. Die Messung der Radioaktivität von ^{32}P-markierten Proben ohne Szintillator erfolgte im Tritium-Kanal unter Ausnutzung der Cerencov-Strahlung. Hierbei lag die Zählausbeute bei etwa 25%.

Szintillationsflüssigkeit: 0,5 % PPO
0,01% POPOP
in Toluol

3.29 Absorptionsmessung

UV-Absorptionsmessungen wurden zur Bestimmung der Reinheit und Konzentration von Nukleinsäuren in Lösungen verwendet. Für die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren gilt, daß 50 µg/ml DNA und 40 µg/ml RNA einer Absorption von 1,0 bei 260 nm entsprechen. Für die Absorptionsmessungen im UV-Bereich sowie für die Messung bei 420 nm bei der Bestimmung der ß-Galaktosidaseaktivität (Kap. 3.10.1) wurden 1,0 cm Quarzküvetten verwendet. Die Trübung bei 600 nm zur Bestimmung der Zelldichte von E.coli wurde in Greiner-Halbmikroküvetten aus Kunststoff bestimmt. Die Messungen wurden an einem Beckman Modell 34 Photometer durchgeführt.

3.30 Silikonisieren von Kunststoffgefäßen und Glaswolle

1,5 ml Eppendorf-Gefäße und Glaswolle wurden vor Gebrauch silikonisiert, um Verluste von DNA durch unspezifische Absorption zu vermeiden. Die Gefäße und die Glaswolle wurden mit Silikonisierlösung benetzt und die Silikonschicht für 1 h bei 100°C im Trockenschrank eingebrannt.

3.31 Aufbereitung von Dialyseschläuchen

Dialyseschläuche wurden für 15 min in 5%iger Essigsäure gekocht und bis zur Neutralität mit H_2O gewaschen. Anschließend wurden sie für 15 min in 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung gekocht und wiederum bis zur Neutralität gewaschen. Die Schläuche wurden in einer 5 mM EDTA, 0,1% Natriumazidlösung bei 4°C aufbewahrt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Der Einfluß der Nukleotidsequenz der tet-Operatoren auf die Bindung des Tn10 Tet-Repressors

In Abb. 4.1 ist die Regulatorregion der tet-Gene von Tn10 dargestellt. Sie enthält zwei palindromische Sequenzen einer Länge von jeweils 19 Basenpaaren. Der Tet-Repressor bindet an die beiden Palindrome, die tet-Operatoren und reprimiert damit die Transkription der beiden Gene tetA und tetR (Hillen et al., 1984).

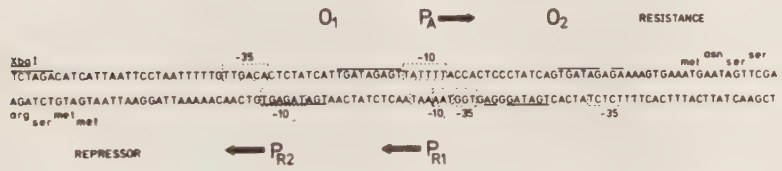


Abb. 4.1: Sequenz der Tn10 tet-Kontrollregion. Die Promotoren der tetA- und tetR-Gene sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die -35- und -10-Konsensus-Sequenzen sind eingerahmt. Die tet-Operatoren sind durch Linien über bzw. unter der palindromischen Sequenz gekennzeichnet. Der Beginn der Leseraster der beiden Gene ist durch die jeweils ersten vier Aminosäuren dargestellt.

Die beiden tet-Operatoren O_1 und O_2 sind in ihrer Nukleotidsequenz nicht identisch (Abb. 4.1). Während die Sequenz des Operators O_1 durchgehend palindromisch ist, befindet sich bei O_2 eine Fehlstelle an Position 7 vom Zentrum aus gerechnet. Daneben unterscheiden sich die beiden Operatoren noch im zentralen Basenpaar und an Position 9. Diese Sequenzunterschiede könnten zu einer unterschiedlichen Erkennung der beiden Bindestellen durch den Repressor führen.

Einen Hinweis auf einen solchen Unterschied lieferten DNaseI-Schutzexperimente, durch die die Bindung des Repressorproteins an die beiden tet-Operatoren gezeigt wurde (Hillen et al., 1984). Abb. 4.2 zeigt ein solches Schutzexperiment mit einem DNA-Fragment, das die

komplette tet-Regulatorregion enthält. Durch die Bindung des Tet-Repressors werden auf beiden Strängen je zwei Bereiche geschützt, die den tet-Operatoren entsprechen. Innerhalb der geschützten Regionen erkennt man je eine DNaseI-sensitive Stelle. Während die beiden sensitiven Stellen im Operator O_1 etwa gleich gut für DNaseI zugänglich sind (vgl. Pos 1 und 4, Abb. 4.2), befindet sich im Operator O_2 eine hypersensitive Stelle auf dem Minusstrang (Pos. 2, Abb. 4.2). Diese unterschiedliche Reaktion der DNaseI auf die beiden Protein-DNA Komplexe könnte einen strukturellen Unterschied zwischen ihnen widerspiegeln.

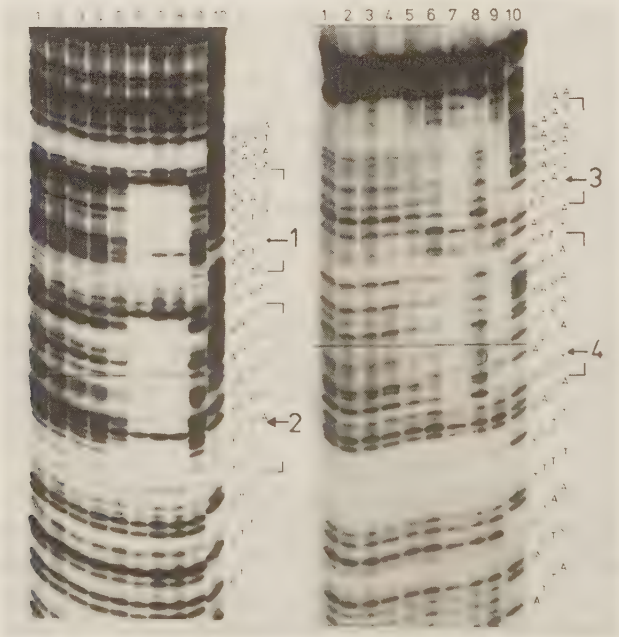


Abb. 4.2: DNaseI-Schutzexperiment der Tn10 tet-Kontrollregion. Im linken Teil der Abbildung ist das Experiment für den Minusstrang, im rechten Teil für den Plusstrang dargestellt. Spur 1+9 bzw. 1+8 zeigen das Spaltungsmuster der DNA ohne Repressor. In Spur 2-8 bzw. 2-7 und 9 sind steigende Mengen an Repressor zugegeben. In Spur 10 wurde eine G+A-spezifische Sequenzierreaktion nach Maxam und Gilbert aufgetragen. Die vom Tet-Repressor geschützten Bereiche sind durch die Einrahmungen der Sequenz dargestellt. Die DNaseI-sensitiven Stellen sind durch Pfeile gekennzeichnet.

In diesem Fall wäre der Repressor-O_2 Komplex im Gegensatz zum Repressor-O_1 Komplex in sich nicht symmetrisch. Da es sich in beiden Fällen um das gleiche Protein-Dimer handelt, kommt als Ursache einer Asymmetrie des Komplexes nur die DNA in Frage. Die einzige Asymmetrie innerhalb der Sequenz von O_2 besteht in dem Basenpaar an Position 7. Diese Fehlstelle innerhalb des Palindroms könnte die Ursache für einen strukturellen Unterschied zwischen den beiden Repressor-Operator Komplexen sein.

Hinweise auf einen quantitativen Unterschied in der Bindung des Repressors an die beiden Operatoren lieferten Kompetitionsexperimente (Schollmeier, 1985). Von den drei Positionen, an denen sich die beiden Operatoren unterscheiden, erscheint auch hierfür die Position 7 am interessantesten. Sowohl das zentrale Basenpaar als auch das Basenpaar an Position 9 sind zwischen den acht bekannten, natürlichen tet-Operatoren der vier Resistenzklassen (Klock et al., 1985) nicht konserviert. Das 9. Basenpaar liegt bei vier der acht Operatoren bereits außerhalb der palindromischen Sequenz. Beide Positionen scheinen daher für die Bindung des Tet-Repressors an die Operatoren nur eine untergeordnete Rolle zu spielen.

In der vorliegenden Arbeit sollte die Bindung des Tet-Repressors an die beiden Operatoren strukturell und quantitativ untersucht werden. Es sollte gezeigt werden, ob das asymmetrische DNaseI-Spaltungsmuster des Repressor-O_2 Komplexes eine asymmetrische Struktur des Komplexes widerspiegelt und ob diese auf die Asymmetrie an Position $\pm$ 7 des Operators zurückzuführen ist. Es sollte untersucht werden, ob es einen quantitativen Unterschied in der Bindung des Repressors an die beiden Operatoren gibt und, wenn ja, welchen Einfluß das 7. Basenpaar auf die Bindung hat.

Die beiden Operatoren O_1 und O_2 waren durch die Konstruktion von Deletionsmutanten voneinander getrennt worden (Hillen et al., 1983; Wray und Reznikoff, 1983). DNA-Fragmente, die jeweils einen der beiden Operatoren enthielten waren bereits für DNaseI-Schutzexperimente eingesetzt worden, die das gleiche Bild wie die Experimente an der gesamten Region ergaben (Schollmeier, 1985). Diese Fragmente konnten für die quantitativen Messungen eingesetzt werden.

Um den Einfluß des 7. Basenpaars von O_2 auf die Bindung des Repres-

sors zu studieren, wurden Operatormutanten konstruiert, die sich an Position 7 von O_2 unterscheiden. Abb. 4.3 zeigt die Mutationen und ihre Benennung.

Abb. 4.3: Nukleotidsequenz der Wildtyp-tet-Operatoren und der synthetisierten Mutanten. Die Nukleotidsequenz der Operatoren O_1 und O_2 sowie der Operatormutanten OM1, OM2 und OM3 ist gezeigt. Die palindromische Symmetrie ist durch die Striche über und unter der Sequenz symbolisiert. Die Basenpaare, die im Verhältnis zu O_2 mutiert wurden, sind eingerahmt. Die Zahlen über der Sequenz nummerieren die Basenpaare der Operatoren vom palindromischen Zentrum ausgehend.

Bei der Mutante OM1 wurde die palindromische Symmetrie von O_2 derart wieder hergestellt, daß sich an Position 7 auf beiden Seiten ein G:C-Basenpaar anstelle eines A:T-Basenpaars wie bei O_1 befindet. Bezüglich des 7. Basenpaars handelt es sich also um eine spiegelbildliche Verdoppelung der linken Operatorhälfe, während O_1 eine solche der rechten Hälfte darstellt. Die Mutanten OM2 und OM3 enthalten Transversionen des Basenpaars +7 bzw. -7 von O_2. Diese Mutanten sollten den Einfluß des Purin/Pyrimidin-Musters an Position 7 auf die Bindung des Repressors zeigen. Die Operatorsequenzen mit den entsprechenden Mutationen

wurden chemisch synthetisiert und durch Klonierung mit flankierenden Sequenzen versehen. Um die Bindung des Tet-Repressors an den Operator O_2 in einer fremden Sequenzumgebung studieren zu können, wurde auch die Originalsequenz von O_2 synthetisiert. Dieser Operator wird im folgenden mit OM bezeichnet. Mit Hilfe von OM sollte gezeigt werden, ob die DNaseI-hypersensitive Stelle tatsächlich durch die Operatorsequenz oder durch flankierende Sequenzen zustande kommt.

4.1.1 Synthese der Oligonukleotide

Die tet-Operatoren wurden als 19 bp lange Oligonukleotide synthetisiert. Sie beinhalten damit die komplette palindromische Sequenz ohne weitere flankierende Basenpaare (s. Abb. 4.3). Die benötigten Oligonukleotide unterscheiden sich an maximal drei Positionen. Sie wurden in vier Synthesen hergestellt, wobei einmal zwei und einmal vier Oligonukleotide durch verzweigte Synthese parallel hergestellt wurden. Abb. 4.4 zeigt die Synthesestrategie.
Die Oligonukleotide wurden durch HPLC aufgereinigt (Kap. 3.22.1) und zu den Doppelsträngen hybridisiert (Kap. 3.23).

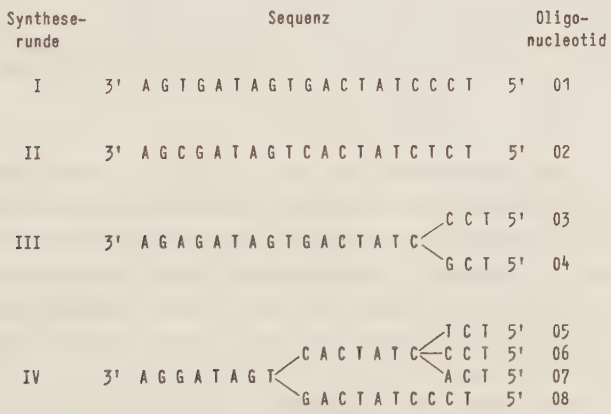


Abb. 4.4: Synthesestrategie der Oligonukleotide. Die Benennung der Oligonukleotide ist am rechten Rand dargestellt.

Folgende Oligonukleotide wurden hybridisiert um die entsprechenden Operatoren zu erhalten:

03 + 05 : OM
06 + 08 : OM1
02 + 04 : OM2
01 + 07 : OM3

4.1.2 Klonierung der synthetischen Operatoren in M13 mp11

Zur Klonierung der synthetisierten Operatoren wurde aus folgenden Gründen der Vektor M13mp11 (Messing, 1983) ausgewählt:

1) Die Operatoren sollten als Insertion in einem längeren DNA-Fragment leicht präparierbar und isolierbar sein. Durch Insertion in den Polylinker von M13 mp11 und anschließende Isolierung des EcoRI-HindIII Fragments liegen die Operatoren auf 64 bp-langen Fragmenten vor.
2) Nach der Klonierung in den Polylinker von M13 mp11 kann die Sequenz der Operatoren durch Isolierung der einzelstängigen DNA und Dideoxisequenzierung nach Sanger et al. (1977) verifiziert werden.
3) Durch Insertion der 19 bp langen Oligonukleotide in die HincII-Stelle des Polylinkers von M13 mp11 wird das Leseraster der ß-Galaktosidase unterbrochen. Rekombinante Phagen können daher leicht identifiziert werden (Kap. 3.4).

5 µg M13 mp11 RF-DNA wurden mit 10 U HincII linearisiert. Je 0,1 µg des linearisierten Vektors wurden mit einem 100-fachen molaren Überschuß an Oligonukleotid unter den Bedingungen für glatte Enden (Kap. 3.12.2) ligiert. Die Oligonukleotide wurden direkt im Anschluß an die Hybridisierung (Kap. 3.23) verwendet. Da die synthetisierten Oligonukleotide keine 5' Phosphatgruppe besitzen, konnten so keine Mehrfachinsertionen entstehen.

Nach Transformation auf E.coli BMH71-18 wurden 5-10% rekombinante Phagen erhalten. Jeweils 10 Kandidaten wurden vereinzelt und die M13 DNA durch Minipräparation isoliert. Zur Analyse wurde eine

Restriktionsverdauung mit HaeIII durchgeführt. Wurde ein Oligonukleotid in die HincII-Stelle insertiert, so wird das 251 bp HaeIII-Fragment von M13 mp11 durch ein 270 bp Fragment ersetzt. (s. Abb. 4.5).

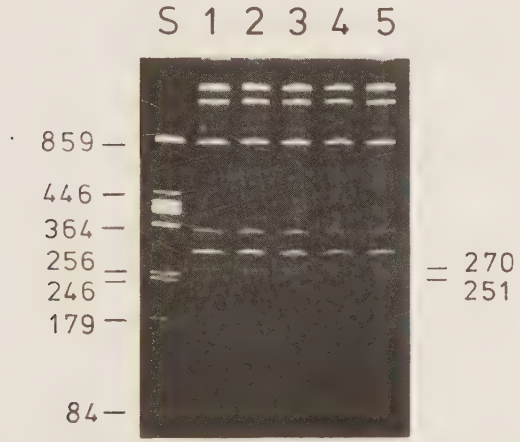


Abb. 4.5: HaeIII-Verdauung der rekombinanten M13-Vektoren. Spur 1: mWH450/HaeIII; Spur2: mWH451/HaeIII; Spur 3: mWH452/HaeIII; Spur 4: mWH453/HaeIII; Spur 5: M13 mp11/HaeIII; Spur S: Längenstandard pVH51/EcoRI/ HaeIII. Die Fragmentlängen sind in Basenpaaren angegeben. Das 251 bp Fragment von M13 mp11 und die 270 bp Fragmente der rekombinanten Phagen sind gekennzeichnet.

Je ein Phage mit der korrekten Struktur wurde zur Präparation von einzelsträngiger DNA verwendet. Die Dideoxisequenzierung zeigte, daß die Oligonukleotide korrekt in die HincII-Stelle insertiert worden waren. Die Autoradiographie ist in Anhang 1 gezeigt. In Abb. 4.6 ist die Sequenz der vier EcoRI-HindIII-Fragmente dargestellt.

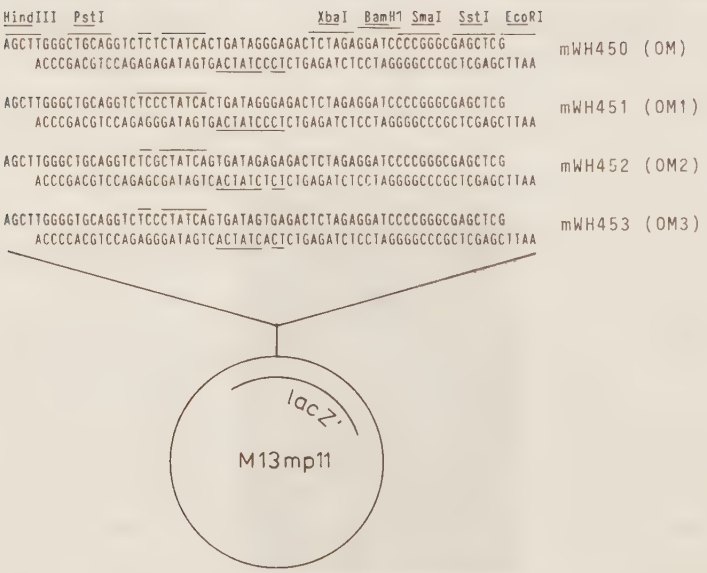


Abb. 4.6: Die Phagen mWH450, mWH451, mWH452 und mWH 453. Die Sequenz der EcoRI-HindIII-Fragmente ist vergrößert dargestellt. Die in die HincII-Stelle insertierten Operatoren sind durch Linien über und unter der Sequenz gekennzeichnet. Ihre Bezeichnung ist der Benennung der Phagen in Klammern zugeordnet.

4.1.3 Insertion der tet-Operatorfragmente in pUR250

Um die Operatorfragmente präparativ leichter zugänglich zu machen, sollten sie in ein Plasmid, das in hoher Kopienzahl vorliegt und relativ klein ist, insertiert werden. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pUR250 (Rüther, 1982) gewählt. pUR250 ist 2700 bp groß und trägt als Selektionsmarker das Gen für Ampicillinresistenz. Daneben trägt das Plasmid ebenso wie M13 mp11 (Sanger et al., 1977) das lacZ'-Gen einschließlich lac-Promotor und lac-Operator sowie einen Polylinker im Beginn des Leserasters der ß-Galaktosidase. Die tet-Operator-Fragmente wurden als EcoRI-HindIII-Fragmente zwischen die EcoRI und die HindIII Stelle des pUR250-Polylinkers kloniert. Rekombinante Plasmide sind

dadurch lacZ'⁻.

Die RF-DNA der Phagen mWH450, mWH451, mWH452 und mWH453 (Abb. 4.6) wurde präpariert. Jeweils 30 µg DNA wurden mit EcoRI und HindIII restringiert und die 64 bp langen EcoRI-HindIII Fragmente wurden durch Elution aus einem 5%igen Polyacrylamidgel isoliert. 20 µg pUR250 wurden mit EcoRI und HindIII verdaut. Zur Abtrennung des 27 bp langen EcoRI-HindIII Fragments wurde der Vektor ebenfalls aus einem 5%igen Polyacrylamidgel eluiert.

Je 1/4 der eluierten Vektor-DNA sowie 1/3 der Fragment-DNA wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisiert und die eluierten Mengen nach Ethidiumbromidfärbung daraus abgeschätzt. Je ca. 100 ng Vektor wurden mit ca. 50 ng Fragment-DNA ligiert und die Ligationsansätze auf E.coli RR1 ΔM15 transformiert. Die Ansätze wurden auf ampicillin- und X-Gal-haltiges Medium (Kap. 3.2, Kap. 3.4) ausplattiert. Je 10 weiße Transformanden wurden vereinzelt und die Plasmide nach Schnellisolierung aus Übernachtkulturen analysiert. Dazu wurde eine SmaI-Verdauung durchgeführt. Der Polylinker von M13 mp11 enthält eine SmaI-Schnittstelle, während sich auf pUR250 keine SmaI-Schnittstelle befindet. Eine Linearisierung mit SmaI zeigt also die Insertion des 64 bp-Fragments an (Abb. 4.7). Die Verdauungsprodukte wurden auf einem 1%igen Agarosegel analysiert und je ein positiver Kandidat wurde zur Präparation der Plasmid-DNA verwendet. Die Plasmide wurden mit EcoRI und HindIII verdaut, um das 64 bp-Fragment nachzuweisen. Eine Verdauung mit PvuII und EcoRI liefert ein 226 bp PvuII-EcoRI-Fragment, das die Insertion enthält. Damit wurde gezeigt, daß es sich um Einfachinsertionen handelt (Abb. 4.7).

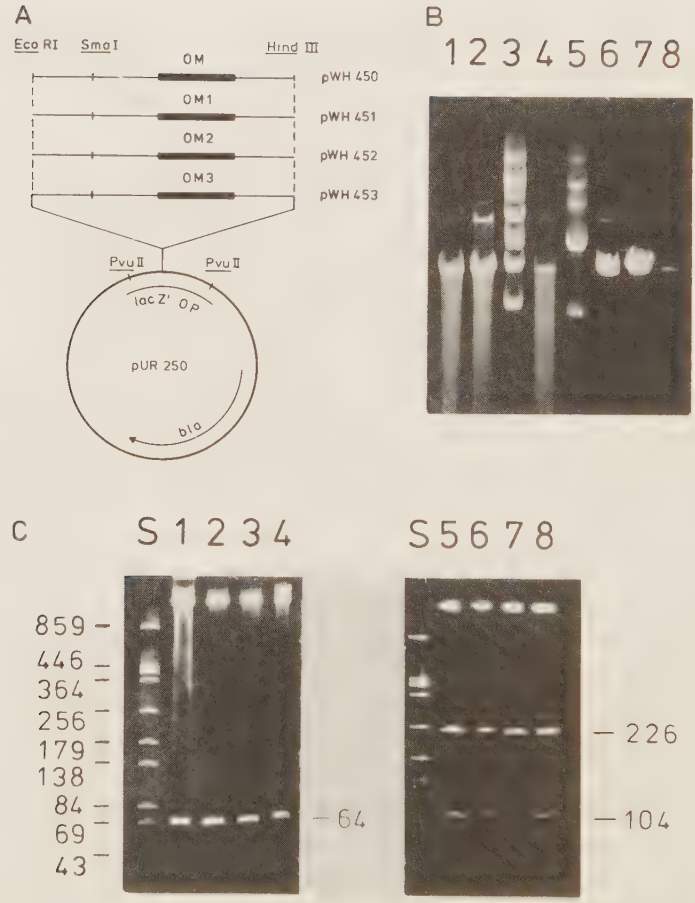


Abb. 4.7: Konstruktion der Plasmide pWH450, pWH451, pWH452 und pWH453. Teil A zeigt die Insertion der 64 bp EcoRI-HindIII Fragmente zwischen die EcoRI und die HindIII-Stelle des Vektors pUR250. Die Operatoren sind durch schwarze Balken dargestellt. Teil B zeigt die Restriktion rekombinanter Plasmide mit SmaI. Spur 5: pUR250/SmaI; Spur 1-4 und 6-8: Kandidaten der Transformation, linearisiert mit SmaI. Teil C: Spur S: Längenstandard: pVH51/EcoRI/HaeIII; Spur 1-4: EcoRI/HindIII-Verdauung; Spur 5-8: EcoRI/PvuII-Verdauung; Spur 1+5: pWH450; Spur 2+6: pWH451; Spur 3+7: pWH452; Spur 4+8: pWH453. Die Längen der Fragmente sind in Basenpaaren angegeben.

4.1.4 DNaseI-Schutzexperimente

Die Bindung des Tet-Repressorproteins an den synthetischen Operator O_2 und die Mutanten des 7. Basenpaars wurde durch DNaseI-Schutzexperimente untersucht.

Als Ausgangsmaterial für diese Experimente wurden die Plasmide pWH450, pWH451, pWH452 und pWH453 eingesetzt (Abb. 4.7). Tn10 Tet-Repressor in reiner Form stand zur Verfügung (Oehmichen et al., 1984).

Die Plasmide wurden sowohl mit EcoRI als auch mit HindIII linearisiert und an den 5' Enden radioaktiv markiert. Durch Restriktionsverdauung mit dem komplementären Enzym entstanden an einem Ende radioaktiv markierte, 64 bp lange Fragmente, bei denen einmal der Plus- und einmal der Minusstrang die radioaktive Markierung trug. Die Fragmente wurden durch Elution aus 5%igen Polyacrylamidgelen isoliert und für die DNaseI-Schutzexperimente eingesetzt. Die DNaseI Reaktion wurde wie in Kap. 3.17 beschrieben durchgeführt.

Für die Experimente mit OM und OM1 (pWH450, pWH451) wurde eine DNA-Konzentration von 2×10^{-9} M verwendet. Bei Verwendung von OM2 und OM3 (pWH452, pWH453) wurde durch Zugabe unmarkierter DNA eine Konzentration von 2×10^{-8} M eingestellt, da erst bei diesen Konzentrationen eine quantitative Bindung von Tet-Repressor an die Operatoren auftrat. Dies deutet bereits auf einen Unterschied in der Bindekonstante hin, der später quantifiziert wurde (Kap. 4.1.4 und 4.1.5). Die jeweiligen Repressorkonzentrationen sind in der Legende von Abb. 4.8 angegeben.

Der erste Teil der Abbildung zeigt das Ergebnis für den Operator OM (O_2). Die sensitive Stelle innerhalb des geschützten Bereichs ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Sie befindet sich auf beiden Strängen an der gleichen Position wie im Operator O_2 in der tet-Kontrollregion (s. Abb. 4.2). Die Zunahme der Intensität der Bande im Vergleich mit dem Spaltungsmuster in Abwesenheit von Repressor zeigt jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen dem Plus- und dem Minusstrang (vgl. OM/+, Spur 1 und 2 und OM/-, Spur 1 und 2 in Abb. 4.8).

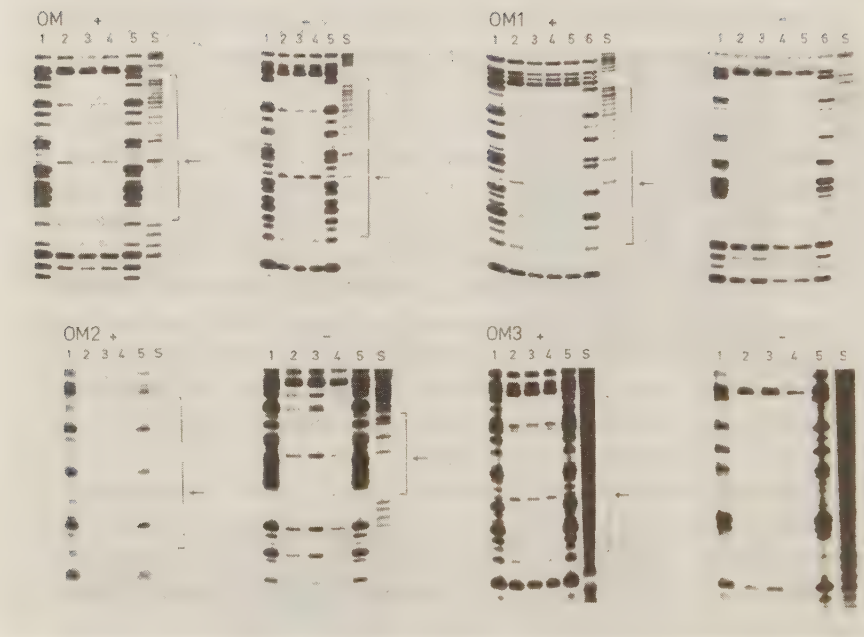


Abb. 4.8: DNaseI-Schutzexperiment der tet-Operatormutanten mit Tet-Repressor. Operator OM: in Spur 1 und 5 wurde kein Tet-Repressor, in Spur 2 ein 50facher, in Spur 3 ein 100facher und in Spur 4 ein 200facher molarer Überschuß an Tet-Repressor über die DNA zugegeben. Operator OM1: in Spur 1 und 6 wurde kein Tet-Repressor, in Spur 2 ein 25facher, in Spur 3 ein 50facher, in Spur 4 ein 100facher und in Spur 5 ein 200facher molarer Überschuß an Tet-Repressor über die DNA zugegeben. Operator OM2: In Spur 1 und 5 wurde kein Tet-Repressor, in Spur 2 ein 150facher, in Spur 3 ein 200facher und in Spur 3 ein 500facher molarer Überschuß an Tet-Repressor über die DNA zugegeben. Operator OM3: In Spur 1 und 5 wurde kein Tet-Repressor, in Spur 2 ein 100facher, in Spur 3 ein 200facher und in Spur 3 ein 500facher molarer Überschuß an Tet-Repressor über die DNA zugegeben. In Spur S ist jeweils die G+A spezifische Maxam und Gilbert Reaktion als Längenstandard aufgetragen. Die durch den Repressor geschützten Bereiche sind durch Einrahmungen gekennzeichnet. Die DNaseI-sensitiven Stellen sind durch Pfeile markiert. Die Symbole + und - bezeichnen den Plus- und Minusstrang der DNA.

In den weiteren Teilen der Abbildung sind die Ergebnisse für die Mutanten OM1, OM2 und OM3 dargestellt. In allen Fällen ist die sensitive Stelle innerhalb des geschützten Bereichs an der gleichen Position wie in den Operatoren O_1 und O_2 zu erkennen. Es wurden keine signifikanten Intensitätsunterschiede festgestellt.

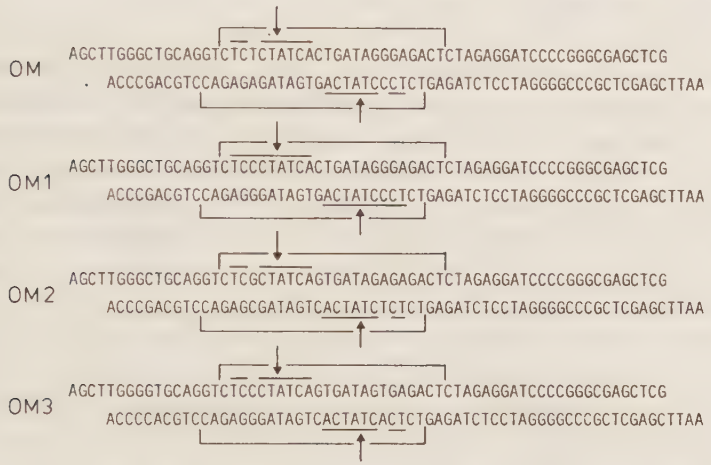


Abb. 4.9: Ergebnis der Schutzexperimente. Die obere Reihe der Sequenz stellt jeweils den Plusstrang, die untere den Minusstrang dar. Die vom Tet-Repressor geschützten Bereiche sind eingerahmt. Die DNaseI-sensitiven Stellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Operatoren sind durch Linien über und unter der Sequenz markiert.

Abb. 4.9 faßt das Ergebnis der Schutzexperimente zusammen. Der vom Repressor vor DNaseI-Spaltung geschützte Bereich der DNA ist für alle vier Fragmente gleich und entspricht dem Ergebnis für den Operator O_2 in der tet-Kontrollregion (Hillen et al., 1984). Sowohl die flankierenden Sequenzen als auch die Mutationen des 7. Basenpaars beeinflussen also die Ausdehnung des gebundenen Repressors auf der DNA nicht. Die beiden DNaseI-sensitiven Stellen sind auf allen vier Fragmenten zu erkennen. Ein signifikanter Unterschied in der Sensitivität konnte nicht festgestellt werden. Da dies auch für die Wildtyp-Operatorse-

quenz OM gilt, hat die hypersensitive Stelle im Operator O_2 in seiner natürlichen Umgebung eine Ursache, die nicht in der Operatorsequenz selbst begründet ist. Sie ist somit kein Zeichen für eine strukturelle Besonderheit des Repressor-O_2 Komplexes

4.1.5 Die Repressor-Operator Bindung in vivo

Um die Affinität des Tet-Repressors zu den beiden Operatoren O_1 und O_2, sowie zu den synthetischen Operatoren OM, OM1, OM2, und OM3 in vivo zu messen, wurde ein System verwendet, in dem die Effizienz der Bildung der Repressor-Operator Komplexe mit einer leicht meßbaren Enzymaktivität verknüpft ist (Wissmann et al., 1986). Anhand von Abb. 4.10 soll das Prinzip der Messung erläutert werden.

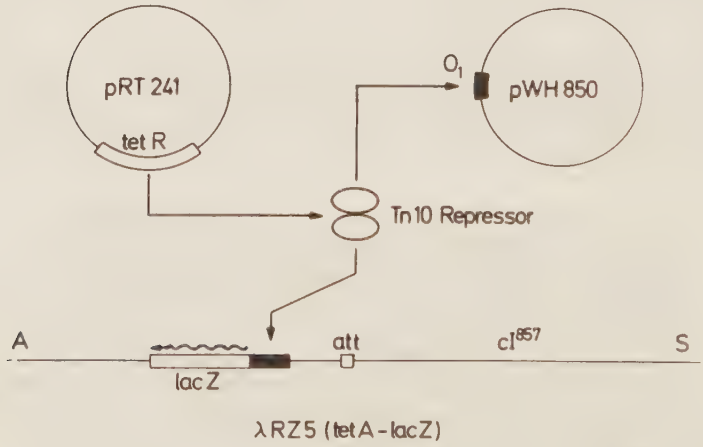


Abb. 4.10: System zur Repressortitration in vivo. Die Abbildung zeigt den im E.coli Chromosom integrierten Phagen λRZ5 mit der tetR-lacZ-Fusion. Das auf dem Plasmid pRT241 lokalisierte tetR Gen exprimiert Tet-Repressor, symbolisiert durch die Ovale. Der Operator O_1 auf dem Plasmid pWH850 und die tet-Kontrollregion auf λ RZ5 sind durch schwarze Balken dargestellt.

Der Stamm E.coli CSH26 (λRZ5) enthält den Phagen λ RZ5 als Prophagen im Genom integriert. CSH26 ist aufgrund der Δprolac-Deletion lac⁻. Der Phage λ RZ5 trägt eine Operonfusion des lacZ-Gens an die Kontrollregion des tetA-Gens (Bertrand et al., 1984). Der Stamm E.coli CSH26 (λ RZ5) ist also lac⁺.

Das Plasmid pRT241 exprimiert konstitutiv den Tet-Repressor in einer ausreichenden Menge, um die chromosomale tet-lac-Fusion zu reprimieren (Wray et al., 1983). Der Stamm CSH26 (λ RZ5)/pRT241 ist phänotypisch Lac⁻. Auf einem zweiten, mit pRT241 kompatiblen und in hoher Kopienzahl vorliegenden Plasmid wird in diesen Stamm ein zusätzlicher tet-Operator eingebracht. Durch dessen Kompetition mit den chromosomalen tet-Operatoren um freien Repressor wird die tet-lac-Fusion dereprimiert. Das Ausmaß an Derepression, meßbar durch die Aktivität der ß-Galaktosidase, ist ein Maß für die Affinität des Tet-Repressors zu dem kompetitierenden Operator. In Abb. 4.10 ist dies der Operator O_1 auf dem Plasmid pWH850, einem pRT291-Derivat (Wissmann et al., 1986). pRT291 ist als pBR322-Derivat (Sutcliff, 1978) mit pRT241, einem pACYC-Derivat (Pouwels et al., 1985), kompatibel. pRT241 kodiert für Kanamycinresistenz, pRT291 für Ampicillinresistenz.

Um die Affinität des Tet-Repressors zu den verschiedenen Operatoren zu bestimmen, wurden diese auf den entsprechenden DNA-Fragmenten in pRT291 insertiert und die rekombinanten Plasmide auf E.coli CSH26 (λ RZ5)/pRT241 transformiert. Anschließend wurde die Expression der chromosomalen tet-lac-Fusion in den verschiedenen Stämmen durch Messung der ß-Galaktosidaseaktivität bestimmt.

Das Plasmid pWH850, das den Operator O_1 auf einem 120 bp langen EcoRI-Fragment trägt (Wissmann, 1985), sowie das Plasmid pRT301, auf dem sich die tet-Kontrollregion mit beiden Operatoren befindet (Wray und Reznikoff, 1983), lagen vor und konnten für die Messungen verwendet werden.

4.1.5.1 Insertion der tet-Operatorfragmente pRT291

Die synthetischen tet-Operatoren OM, OM1, OM2 und OM3 wurden auf 64 bp langen EcoRI-HindIII-Fragmenten (Abb. 4.6) zwischen die EcoRI und die HindIII-Stelle von pRT291 insertiert. Daneben wurde der Opera-

tor O_2 auf einem 350 bp langen EcoRI-Fragment (Hillen et al., 1983) in die EcoRI-Stelle von pRT291 insertiert, um zu prüfen, ob die Affinität des Repressors für OM die gleiche ist wie für O_2 in dieser Konstruktion.

Als Quelle für die synthetischen Operatoren wurden die Plasmide pWH450, pWH451, pWH452 und pWH453 verwendet (Abb. 4.7). Je 50 µg Plasmid wurden mit EcoRI und HindIII restringiert und die 64 bp langen EcoRI-HindIII Fragmente wurden durch Elution aus einem 5%igen Polyacrylamidgel isoliert.

10 µg pRT291 wurden mit EcoRI und HindIII restringiert. Um eine Reinsertion des dabei entstehenden 300 bp langen EcoRI-HindIII Fragments bei der Ligation mit den Operator-Fragmenten zu verhindern, wurden die 5'-Enden der DNA mit Alkalischer Kälberdarmphosphatase dephosphoryliert (Kap. 3.12.4). 2 µg pRT291 wurden mit EcoRI linearisiert und anschließend ebenfalls dephosphoryliert, um als Vektor für die Insertion des 350 bp EcoRI-Fragments mit dem Operator O_2 zu dienen.

Je 0,1 µg Vektor wurden mit ca. 0,1 µg der Fragmente ligiert und die Ansätze wurden auf E.coli CSH26 (λ RZ5)/pRT241 transformiert. Die Ansätze wurden auf McConkey-Agar-Platten (Kap. 3.4) mit den Antibiotika Ampicillin und Kanamycin ausplattiert. Transformanden, die auf diesen Platten als rote Kolonien wachsen, d.h. die ß-Galaktosidase exprimieren, sollten ein rekombinantes pRT291-Derivat tragen. Sie wurden vereinzelt und weiter analysiert. Die Plasmide wurden durch Schnellpräparation aus Übernachtkulturen isoliert und auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Plasmide, die das 350 bp EcoRI-Fragment insertiert hatten, mußten größer sein als pRT291. Solche, die anstelle des ca. 300 bp langen EcoRI-HindIII Fragments des Vektors das 64 bp Operatorfragment isertiert hatten, mußten kleiner sein.

Abbildung 4.11 zeigt im linken Teil Kandidaten der Klonierung des 350 bp-Fragments, im rechten Teil solche der Klonierung der 64 bp EcoRI-HindIII-Fragmente. Im rechten Teil der Abbildung ist zusätzlich pRT241, das sich ebenfalls in den Zellen befindet, zu erkennen.

Um die rekombinanten Plasmide präparieren zu können, mußten diese wieder von pRT241 getrennt werden. 1/10 der durch Schnellpräparation isolierten Plasmid-DNA eines positiven Kandidaten wurden auf E.coli RR1 transformiert und die Transformationsansätze auf LB-Platten mit

Ampicillin ausplattiert. Je fünf Transformanden wurden sowohl auf ampicillinhaltige als auch auf kanamycinhaltige Platten ausgestrichen. Alle getesteten Transformanden waren kanamycinsensitiv, d.h. sie enthielten nur noch die pRT291-Derivate.

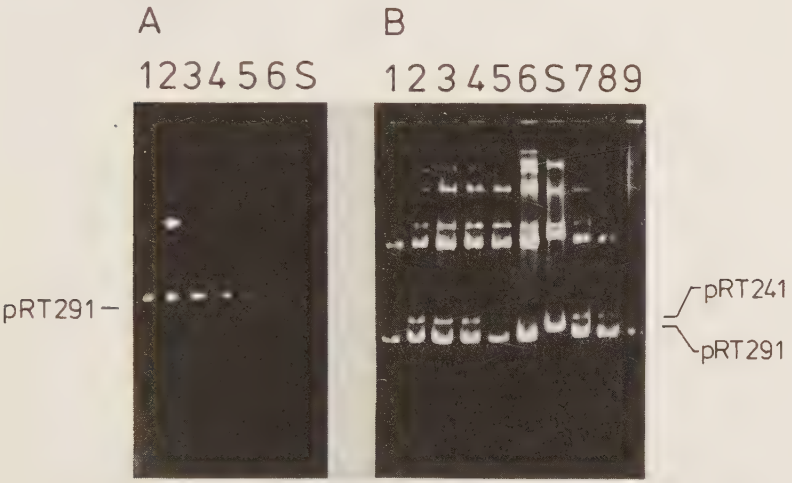


Abb. 4.11: Größenanalyse der Plasmide aus Transformanden. Teil A zeigt Kandidaten der Konstruktion von pWH851. Spur S: pRT291; Spur 1-6: Plasmide aus 6 Transformanden. Teil B zeigt Kandidaten der Konstruktion von pWH460. Spur S: pRT291; Spur 1-9: Plasmide aus 9 Transformanden.

Die Plasmide wurden aus je einem Liter Kultur präpariert. Zum Nachweis der insertierten Fragmente wurden je 10 µg entweder mit EcoRI (350 bp EcoRI-Fragment) oder mit EcoRI und HindIII (64 bp EcoRI-HindIII-Fragment) verdaut. Die Verdauungsprodukte wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel analysiert. Abb. 4.12 zeigt in Teil B das Ergebnis der Verdauungen. Die vier 64 bp Fragmente und das 350 bp Fragment werden durch die Restriktion aus den Plasmiden entlassen. Teil A der Abbildung zeigt die Karten der Plasmide und ihre Benennung.

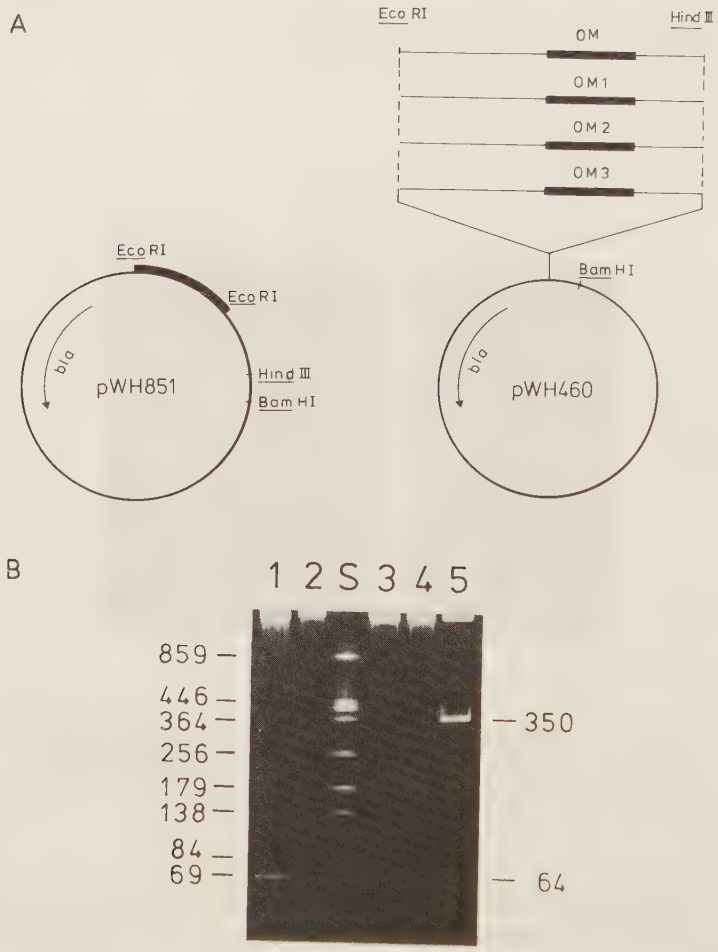


Abb. 4.12: Konstruktion der Plasmide pWH851 sowie pWH460, pWH460(OM1), pWH460(OM2) und pWH460(OM3). Teil A zeigt die Karten der Plasmide und ihre Benennung. Teil B zeigt die Restriktionsanalyse. Spur 1: pWH460/EcoRI/HindIII; Spur 2: pWH460(OM1)/EcoRI/HindIII; Spur 3: pWH460(OM2)/EcoRI/HindIII; Spur 4: pWH460(OM3)/EcoRI/HindIII; Spur 5: pWH851/EcoRI; Spur S: Längenstandard: pVH27/EcoRI/HaeIII. Die Fragmentlängen sind in Basenpaaren angegeben.

4.1.5.2 Messung der Repressor-Operator Affinitäten

Die verschiedene tet-Operatoren enthaltenden Plasmide wurden verwendet, um die Affinität des Repressors zu den beiden Operatoren O_1 und O_2 sowie zu den Operatormutanten mit Hilfe des in vivo Titrationssystems zu bestimmen. Hierzu wurden die in Tab. 4.1 aufgeführten Plasmide auf den Stamm CSH26 (λ RZ5)/pRT241 transformiert.

Tabelle 4.1: Zur Messung im in vivo Titrationssystem eingesetzte Plasmide

Plasmid	Operatoren
pRT291	---
pRT301	$O_1 + O_2$
pWH850	O_1
pWH851	O_2
pWH460	OM
pWH460 (OM1)	OM1
pWH460 (OM2)	OM2
pWH460 (OM3)	OM3

Die Transformationsansätze wurden auf LB-Platten mit Ampicillin und Kanamycin ausplattiert. Je drei Transformanden wurden vereinzelt und für die Messung der ß-Galaktosidaseaktivität eingesetzt. Zur Bestimmung der maximalen Aktivität sowie der maximalen Repression wurden je drei Kolonien der Stämme CSH26 (λ RZ5) und CSH26 (λ RZ5)/pRT241 zur Messung eingesetzt. Tab. 4.2 zeigt die Ergebnisse der Messung.

Die Expression der chromosomalen tet-lac-Fusion (Zeile 1), wird in Anwesenheit des Repressor-exprimierenden Plasmids pRT241 reprimiert (Zeile 2). Die zusätzliche Anwesenheit des Vektors pRT291 ändert nur wenig an dem Wert für minimale Expression des Systems (Zeile 3). Die Anwesenheit der tet-Kontrollregion auf dem Plasmid pRT301 dereprimiert das System durch Kompetition der Operatoren um den freien Tet-Repressor (Zeile 4). Die Aktivität dieses Stammes stellt die maximal zu erwartende Derepression dar und zeigt damit den möglichen Meßbereich. Alle Konstruktionen mit Einzeloperatoren dereprimieren das System ebenfalls (Zeile 5-10). Die mutierten Operatoren (Zeile 8-10) werden also vom Tet-Repressor spezifisch erkannt.

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Repressortitration durch die tet Operatoren und Operatormutanten.

Zeile	E.coli Stamm	Operator	β-Galakto-sidase-Akt.	Standard-abweichung
1	CSH26 (λRZ5)	---	3650	640
2	CSH26 (λRZ5)/pRT241	---	47	5
3	CSH26 (λRZ5)/pRT241/pRT291	---	58	7
4	CSH26 (λRZ5)/pRT241/pRT301	O_1+O_2	2120	130
5	CSH26 (λRZ5)/pRT241/pWH850	O_1	480	170
6	CSH26 (λRZ5)/pRT241/pWH851	O_2	1230	280
7	CSH26 (λRZ5)/pRT241/pWH460	OM	1210	180
8	CSH26 (λRZ5)/pRT241/pWH460 (OM1)	OM1	570	70
9	CSH26 (λRZ5)/pRT241/pWH460 (OM2)	OM2	145	10
10	CSH26 (λRZ5)/pRT241/pWH460 (OM3)	OM3	220	20

Die beiden Operatoren O_1 und O_2 dereprimieren die tet-lac-Fusion unterschiedlich stark (Zeile 5 und 6). Der Operator O_2 hat einen etwa 2,5fach höheren Effekt als O_1. Der Operator O_2 als synthetisches Oligonukleotid OM in einer neuen Sequenzumgebung hat den gleichen Effekt wie O_2 auf dem 350 bp-Fragment (Zeile 6 und 7). Der Operator OM1, die symmetrische Verdopplung der linken Hälfte von O_2 bewirkt eine geringere Derepression als O_2 (Zeile 8). Die beiden Operatoren OM2 und OM3, die Transversionen der Basenpaare -7 und +7 enthalten, dereprimieren das System um einen Faktor 5-8 schlechter als der Operator O_2 (Zeile 7, 9 und 10).

Die Affinität des Repressors zum Operator O_2 ist also um den Faktor 2-3 höher als zu O_1. Zwischen dem synthetischen Operator OM und O_2 auf dem 350 bp-Fragment besteht kein Unterschied, d.h. daß keine Sequenzen außerhalb des 19 bp-Palindroms für die Bindung des Tet-Repressors von Bedeutung sind. Der symmetrische Operator OM1 bindet den Repressor schlechter als O_2, d.h. die Affinität des Tet-Repressors für einen Operator, der an Position ± 7 ein G:C-Basenpaar trägt, ist geringer, als für den Operator O_2, der an Position -7 ein G:C und an Position +7 ein A:T Basenpaar trägt. Transversionen an Position ± 7 (OM2 und OM3)

reduzieren die Affinität des Repressors stärker als Transitionen.

4.1.6 Dissoziationskinetiken der Repressor-Operator Komplexe

Um die in vivo gefundenen Unterschiede in der Bindung des Tet-Repressors an die Operatoren O_1 und O_2 sowie die Operatormutanten in vitro zu quantifizieren, wurden die Geschwindigkeitskonstanten der Dissoziation der Repressor-Operator Komplexe bestimmt. Der Operator O_1 wurde auf einem isolierten 120 bp EcoRI-Fragment eingesetzt, das mir vom M. Geißendörfer zur Verfügung gestellt wurde.

Der Operator O_2 wurde in Form des synthetischen Operators OM verwendet. OM, OM1, OM2 und OM3 wurden als 226 bp EcoRI-PvuII-Fragmente aus den Plasmiden pWH450, pWH451, pWH452 und pWH453 eingesetzt. Die Reaktionsansätze enthielten in diesem Fall neben den Operatorfragmenten noch den Vektor sowie ein 104 bp langes Vektor-Fragment, das bei der EcoRI-PvuII-Verdauung entsteht. Je 10 pmol der eingesetzten Fragmente wurden mit $\gamma\ ^{32}$P-ATP radioaktiv endmarkiert (Kap. 3.12.5). Das überschüssige $\gamma\ ^{32}$ P-ATP wurde durch G50-Chromatographie von der DNA abgetrennt (Kap. 3.25). Die Messungen wurden wie in Kap. 3.20 beschrieben durchgeführt. Als kompetitierende DNA wurde ein 187 bp langes Fragment, das die komplette tet-Kontrollregion enthält, eingesetzt (Hillen et al., 1982).

Um zu zeigen, daß die Anwesenheit von unspezifischer DNA in den Ansätzen keinen Einfluß auf die Messung hat, wurden bei den Messungen mit dem 120 bp O_1-Fragment zum Teil äquimolare Mengen an EcoRI-linearisierter pUR250-DNA zugesetzt. Dies hatte keinen Einfluß auf die bestimmten Halbwertszeiten.

Alle Messungen wurden mindestens dreimal wiederholt. Die Dissoziationsreaktionen wurden über die Dauer von ca. zwei Halbwertszeiten verfolgt. Abbildung 4.13 zeigt das Ergebnis jeweils einer exemplarischen Messung. In Tabelle 4.3 sind die Ergebnisse der Messungen zusammengefaßt. Die Halbwertszeiten der Dissoziation des Repressor-O_1 Komplexes und des Repressor-O_2 Komplexes liegen bei 10 min bzw. 20 min. Unter der Voraussetzung, daß die Assoziationskonstante für beide Komplexe gleich ist, bedeutet dies, daß die Bindekonstante des

Repressor-O_1 Komplexes um den Faktor 2 niedriger ist als die des Repressor-O_2 Komplexes.

Die Halbwertszeit des Repressor-OM1 Komplexes beträgt ebenfalls etwa 10 min. Die Halbwertszeit der Repressor-OM2 und -OM3 Komplexe betragen 2,7 bzw. 2,5 min und sind damit um den Faktor 8 niedriger als die des Repressor-O_2 Komplexes.

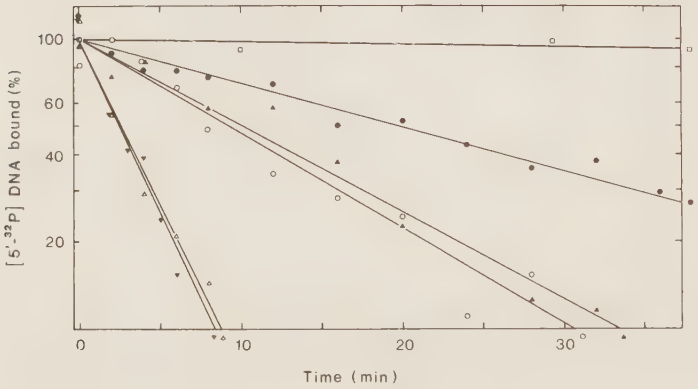


Abb. 4.13: Dissoziationsgeschwindigkeit der WT- und Mutanten-Operator-Repressor Komplexe. Der Logarithmus der filtergebundenen Radioaktivität ist gegen die Zeit aufgetragen. Die Symbole am Rand des Diagramms ordnen die Regressionsgeraden den entsprechenden Meßpunkten zu. □:Stabilität der Komplexe in Abwesenheit kompetitierender DNA; ●: O_2; ○:O_1; ▲: OM1; △: OM2; ▼: OM3.

Tabelle 4.3: Dissoziationskonstanten und Halbwertszeiten der Dissoziation von Repressor-Operator Komplexen.

Operator	$T_{1/2}$ (min)	K_{Diss} (sec^{-1}) x 10^3
O_1	9,5 ± 0,9	1,2 ± 0,1
O_2	20,2 ± 1,6	0,6 ± 0,05
OM1	10,9 ± 0,8	1,0 ± 0,07
OM2	2,7 ± 0,3	4,4 ± 0,6
OM3	2,5 ± 0,3	4,7 ± 0,5

Insgesamt stimmen die Werte gut mit den Ergebnissen aus der in vivo Repressortitration überein (Kap. 4.1.5). Aus beiden Messungen geht hervor, daß die Affinität des Tet-Repressors zu den beiden Operatoren O_1 und O_2 verschieden ist, wobei die Affinität für den Operator O_2 etwa doppelt so groß ist wie für O_1. Das Basenpaar an Position 7 ist in die Bindung des Repressors involviert, seine Mutation verändert dessen Affinität zum Operator. Alle untersuchten Mutationen reduzieren dabei die Affinität, wobei sich Transversionen stärker auswirken als Transitionen.

4.2 Der Einfluß des Abstands der beiden Operatorhälften auf die Bindung des Tn10 Tet-Repressors

Der Tet-Repressor bindet als Dimer an die tet-Operatoren (Hillen et al., 1983). Strukturuntersuchungen an anderen Repressor-Operator Komplexen zeigten, daß dort jeweils ein Protein-Monomer mit einer Hälfte des palindromischen Operators wechselwirkt (Anderson et al, 1981; McKay und Steitz, 1981; Pabo und Lewis, 1982). Dabei bilden bestimmte Aminosäureseitengruppen des Proteins Wasserstoffbrücken mit den Basenpaaren der DNA aus (Ohlendorf et al., 1982; Pabo und Sauer, 1984). In diesem Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit der Abstand der palindromischen Hälften eines Operators zueinander und damit auch die räumliche Anordnung der beiden Hälften auf der DNA-Doppelhelix die Bindung des Tet-Repressors beeinflußt.

Durch Deletion bzw. Verdopplung des zentralen Basenpaars wurde der Abstand zwischen den beiden Operatorhälften um ein Basenpaar verlängert bzw. verkürzt und der Winkel zwischen den beiden Operatorhälften gleichzeitig um jeweils 36° verändert.

Für diese Experimente wurde der vollständig symmetrische Operator O_1 verwendet (Abb.4.14). Die Strategie zur Klonierung der mutierten Operatoren und zur Bindungsmessung mit dem Tet-Repressor war im Prinzip die gleiche wie die zur Untersuchung der Mutanten des 7. Basenpaars (Kap. 4.1). Wie dort wurden auch hier die Operatormutanten als Oligonukleotide chemisch synthetisiert, in einen M13-Vektor kloniert und in dieser Form durch Sequenzierung verifiziert. Anschließend wurden Restriktionsfragmente mit den Operatoren in pRT291 (Wray und Reznikoff, 1983) umkloniert, um die Bindung des Tet-Repressors an die Mutanten in vivo durch Kompetition mit einer chromosomalen Genfusion zu untersuchen.

4.2.1 Synthese der Oligonukleotide

In Abb. 4.14 sind die beiden Operatormutanten dargestellt. Bei beiden Operatoren sind der Plus- und der Minus-Strang identisch, so daß

nur je ein Oligonukleotid benötigt wurde. O_1^{+1} wurde maschinell synthetisiert (Kap. 3.21). O_1^{-1} wurde mir freundlicherweise von F. Buck, Frankfurt, zur Verfügung gestellt. O_1^{+1} wurde durch Gelelektrophorese aufgereinigt, O_1^{-1} wurde ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Im Anschluß an die Hybridisierung zum Doppelstrang wurden sie unphosphoryliert zur Ligation eingesetzt.

Abb. 4.14: Die Sequenz des Operators O_1 und der Operatormutanten O_1^{+1} und O_1^{-1}. Die Linien über und unter der Sequenz bezeichnen die palindromische Symmetrie der Operatoren. Die gestrichelte Linie bezeichnet das Zentrum der Symmetrie. Das zentrale T:A Basenpaar von O_1 wurde bei O_1^{+1} symmetrisch verdoppelt, bei O_1^{-1} deletiert.

4.2.2 Klonierung der synthetischen Operatoren in M13 mp10

Zur Klonierung der O_1-Abstandsmutanten O_1^{-1} und O_1^{+1} wurde der Vektor M13 mp10 verwendet (Messing, 1983). Da bei O_1^{-1} mit einer Länge von 18 Basenpaaren keine Verschiebung im Leseraster der ß-Galaktosidase auftritt, wurde eine Schnittstelle gewählt, bei der durch Insertion von O_1^{-1} ein Stopcodon im Leseraster der ß-Galaktosidase entsteht. Dies wird durch Klonierung in die SmaI-Schnittstelle von M13 mp10 erreicht (Abb. 4.15).

Bei der Klonierung von O_1^{+1} mit einer Länge von 20 Basenpaaren entsteht eine Leserasterverschiebung. Um eine identische Sequenzumgebung für beide Operatoren zu erhalten wurde auch O_1^{+1} in die SmaI-Stelle von M13 mp10 insertiert.

1 µg M13 mp10 RF-DNA wurde mit SmaI linearisiert und die Vollständigkeit der Verdauung auf einem 1%igen Agarosegel kontrolliert. Je 0,1 µg Vektor wurden mit einem 100 fachen molaren Überschuß an Oligonukleotid unter Bedingungen für glatte Enden ligiert. Die Ligationsansätze wurden auf E.coli BMH71-18 transformiert. Ca. 30% der Transformanden wurden durch die Bildung von weißen Plaques auf Indikatorplatten (Kap. 3.4) als rekombinant identifiziert.

Je 10 Kandidaten wurden vereinzelt. Die M13 RF-DNA wurde durch Minipräparation isoliert und durch eine HaeIII-Verdauung und anschließende Elektrophorese auf einem 5%igen Polyacrylamidgel analysiert (Abb. 4.15 B). Je ein Phage, der die korrekte Struktur, d.h. anstelle des 251 bp langen HaeIII-Fragments von M13 mp10 ein ca. 270 bp langes Fragment hatte, wurde vermehrt. Die einzelsträngige DNA wurde isoliert, und die Sequenz der Operator-Fragmente wurde bestimmt. Die Autoradiographie ist in Anhang 1 dargestellt. Abbildung 4.15 A zeigt die Konstruktion und Benennung der Vektoren sowie die Sequenz der Fragmente.

4.2.3 Insertion der tet-Operatorfragmente in pRT291

Die Bindung des Repressors an die Mutanten sollte in vivo durch Kompetition um den Repressor mit der chromosomalen tet-lac-Fusion untersucht werden. Das Prinzip dieses Systems wurde ausführlich in Kap. 4.1.5 beschrieben. Hierzu mußten die Operatorfragmente zunächst in pRT291 (Wissmann et al., 1986) umkloniert werden.

Jeweils 50 µg mWH454 und mWH455 (Abb. 4.15) wurden zunächst mit EcoRI linearisiert und anschließend mit HindIII verdaut. Je 5 µg der restringierten DNA wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel analysiert, um das Auftreten des 65 bp bzw. 63 bp EcoRI-HindIII-Fragments zu kontrollieren. Die restlichen Verdauungsansätze wurden auf ein 5%iges Polyacrylamidgel aufgetragen und das 65 bp bzw. 63 bp Fragment wurde aus dem Gel eluiert.

Der Vektor pRT291 war bereits für die Klonierung der Operator-Fragmente in Kap 4.1 verwendet worden. Die gleiche DNA wurde hier für die Klonierung der O_1^{+1}- bzw. O_1^{-1}-Fragmente eingesetzt (Kap. 4.1.5.1).

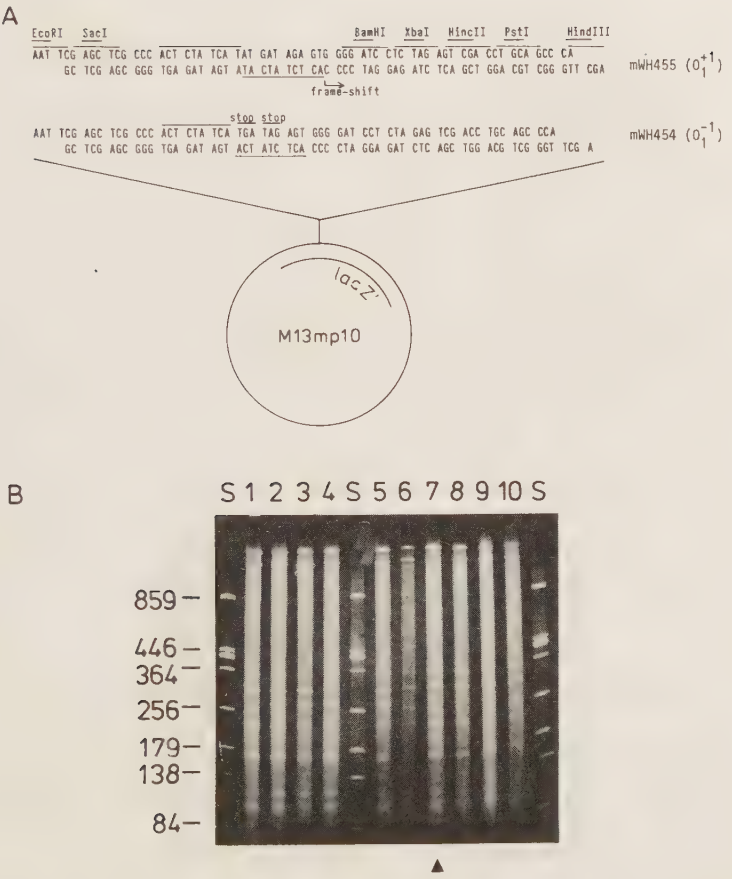


Abb. 4.15: Konstruktion der M13-Phagen mWH454 und mWH455. Teil A: Die Sequenz der EcoRI/HindIII Fragmente ist vergrößert dargestellt. Die in die SmaI-Stelle insertierten Operatoren sind durch Linien über und unter der Sequenz dargestellt. Ihre Bezeichnung ist der Benennung der Phagen in Klammern zugeordnet. Der Beginn der Leserasterverschiebung bei mWH455 und die Positionen der beiden Stopcodons bei mWH454 sind markiert. Teil B zeigt HaeIII Verdauungen von Kandidaten der Transformation. Spur S: Längenstandard pVH27/EcoRI/HaeIII. Spur 1-9: HaeIII Verdauungen rekombinanter M13-Phagen. Spur 10: M13 mp10/HaeIII. Der mit einem Pfeil gekennzeichnete Phage wurde sequenziert.

Je ca. 0,1 µg des Vektors wurden mit ca. 0,1 µg der Operatorfragmente ligiert und die Ligationsansätze wurden auf E.coli RR1 transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert.

Je 10 Transformanden wurden vereinzelt und die Plasmid-DNA wurde durch Schnellpräparation aus Übernachtkulturen isoliert. Die Größe der pRT291-Derivate wurden auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Durch Ersatz des ca. 300 bp EcoRI-HindIII-Fragments aus pRT291 durch das 65 bp bzw. 63 bp Operatorfragment mußten die rekombinanten Plasmide kleiner sein als der Vektor (Abb. 4.16).

Je ein positiver Kandidat wurde zur Präparation der Plasmid-DNA verwendet. Die Plasmide wurden zur Analyse sowohl mit EcoRI und HindIII als auch mit SacI und HindIII verdaut. Abb. 4.16 zeigt die Ergebnisse. Die EcoRI-HindIII Verdauung setzt das 65 bp bzw. 63 bp Operator-Fragment frei. Durch die SacI-HindIII Verdauung entsteht ein etwas kürzeres Fragment, entsprechend dem Abstand von 6 bp zwischen der EcoRI und der SacI Stelle (s. Abb.4.15). Dies zeigt, daß das korrekte 65 bp bzw. 63 bp Fragment, das den Operator im Polylinker von M13 mp10 trägt, insertiert wurde.

4.2.4 Bindung des Tet-Repressors an die Operator-Abstands-Mutanten

Zur Untersuchung der Bindung des Tet-Repressors an die Operatormutanten wurde das in Kap. (4.1.5) beschriebene in vivo Titrationssystem verwendet.

Folgende Plasmide wurden hierzu auf den Stamm CSH26 (λ RZ5)/pRT241 transformiert:

Plasmid	Operatoren
pRT291	---
pRT301	O_1+O_2
pWH850	O_1
pWH851	O_2
pWH464	O_1^{-1}
pWH465	O_1^{+1}

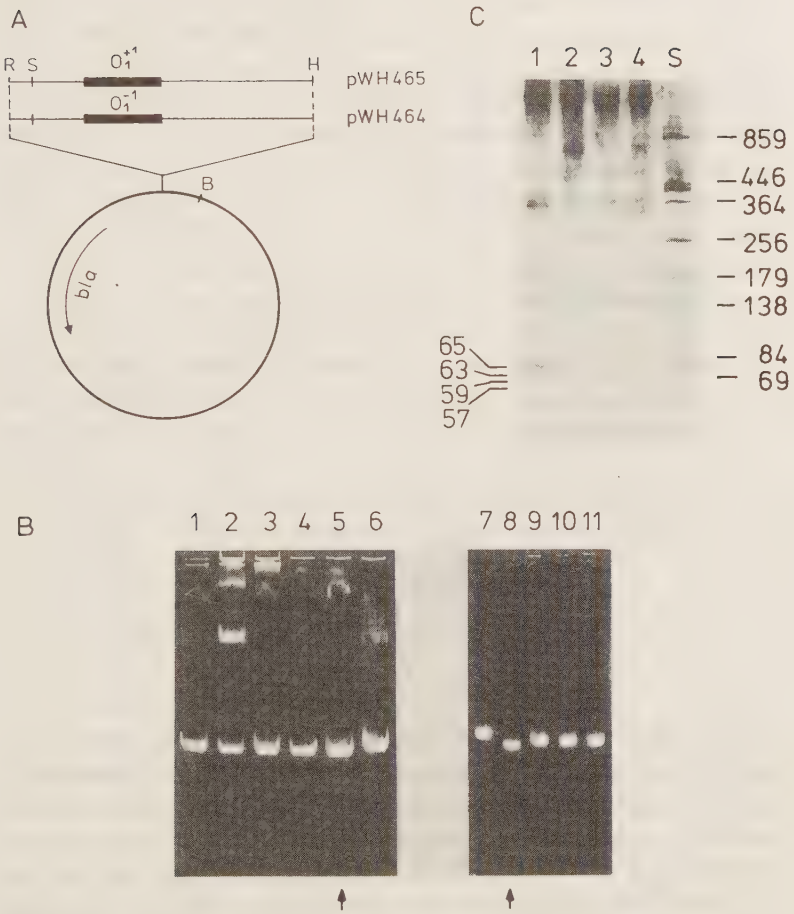


Abb. 4.16: Konstruktion der Plasmide pWH464 und pWH465. Teil A der Abbildung zeigt die Karte der Plasmide pWH464 und pWH465. R: EcoRI; S: SacI; H: HindIII; B: BamHI. Teil B zeigt die Größenanalyse von Kandidaten der Transformation. Spur 1-5: Transformanden der Klonierung des O_1^{-1}-Fragments. Spur 6 und 7: pRT291. Spur 8-11: Kandidaten der Klonierung des O_1^{+1}-Fragments. Die mit einem Pfeil gekennzeichneten Plasmide wurden präpariert. Teil C zeigt die Restriktionsanalyse der Plasmide pWH464 und pWH465. Spur 1: pWH465/EcoRI/HindIII; Spur 2: pWH465/SacI/ HindIII; Spur 3: pWH464/EcoRI/ HindIII; Spur 4: pWH464/SacI/ HindIII; Spur 5: Längenstandard: pVH27/EcoRI/ HaeIII. Die Fragmentlängen sind in Basenpaaren angegeben.

Je drei Transformanden wurden vereinzelt und zur Messung der ß-Galaktosidaseaktivität eingesetzt. Zur Bestimmung der maximalen Expression sowie der maximalen Repression wurden je drei Kolonien der Stämme E.coli CSH26 (λ RZ5) sowie E.coli CSH26 (λ RZ5)/pRT241 ebenfalls für die Messung verwendet. Die Ergebnisse der Messung sind in Tab. 4.4 dargestellt.

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Repressortitration durch die tet-Operatoren und Operatormutanten.

Zeile	E.coli Stamm	Operator	ß-Galakto-sidase-Akt.	Standard-abweichung
1	CSH26 (λ RZ5)	--	3152	212
2	CSH26 (λ RZ5)/pRT241	--	42,2	2,4
3	CSH26 (λ RZ5)/pRT241/pRT291	--	58,5	1,6
4	CSH26 (λ RZ5)/pRT241/pRT301	$O_1 + O_2$	2597	248
5	CSH26 (λ RZ5)/pRT241/pWH850	O_1	652	163
6	CSH26 (λ RZ5)/pRT241/pWH851	O_2	1308	148
7	CSH26 (λ RZ5)/pRT241/pWH464	O_1^{-1}	59,9	1,6
8	CSH26 (λ RZ5)/pRT241/pWH465	O_1^{+1}	62,8	3,6

Die durch pRT241 reprimierte chromosomale tet-lac Fusion (Zeile 1,2,3) wird in Anwesenheit der Wildtypoperatoren O_1 und O_2 exprimiert (Zeile 4,5,6). Dagegen liegt die Expression der pWH464 und pWH465-tragenden Stämme im Bereich des Blindwertes (vgl. Zeile 3,7,8). Die Bindung des Tet-Repressors an die Mutanten ist also drastisch reduziert. Es kann nichts darüber ausgesagt werden, ob es überhaupt noch eine spezifische Bindung von Tet-Repressor an die Operatorsequenzen gibt. Die Erkennung der Operatorsequenz durch den Tet-Repressor ist also in hohem Maße vom Abstand bzw. der räumlichen Anordnung der beiden Operatorhälften zueinander abhängig.

4.3 Die Funktion der Operatoren O_1 und O_2 bei der Regulation der Gene tetA und tetR

Eine Voraussetzung für die differentielle Regulation mehrerer Gene durch ein Protein ist der unterschiedliche Einfluß der Protein-DNA Komplexe auf deren Regulation. Um die Regulation der Expression von tetA und tetR durch jeweils nur einen Repressor-Operator Komplex zu untersuchen, sollten die beiden Operatoren O_1 und O_2 innerhalb der tet-Regulatorregion selektiv inaktiviert werden.

Aufgrund von Mutageneseexperimenten war bekannt, daß sich der Austausch eines der beiden G:C-Basenpaare an Position +2 oder -2 des Operators O_1 (Abb. 4.3) gegen ein A:T Basenpaar drastisch auf die Bindung des Tet-Repressors auswirkt. Operatoren mit dieser Mutation titrierten Repressor in dem in Kap. 4.1.5 beschriebenen in vivo Titrationssystem nicht mehr (Wissmann et al., 1986).

Durch gerichtete Mutagenese mit Hilfe synthetischer Oligonukleotide sollten diese Basenpaaraustausche in die tet-Regulatorregion eingeführt werden, um Mutanten zu konstruieren, die eine selektive Besetzung von jeweils nur einem Operator mit Tet-Repressor erlauben. In Abb. 4.17 sind die tet-Regulatorregion und die Positionen der eingeführten Mutationen dargestellt.

Die Abbildung zeigt, daß die Basenpaare an Position $\pm$ 2 in beiden Operatoren nicht mit den - 10 und - 35 Konsensussequenzen der drei Promotoren überlappen. Eine Mutation der Operatoren an diesen Positionen sollte also nicht zu einer gleichzeitigen Inaktivierung der Promotoren führen. Die Einführung der Mutationen auf jeweils beiden Operatorhälften sollte die Repressorbindung noch deutlicher verringern als die beschriebenen Einfachmutationen (Wissmann et al., 1986).

Im Anschluß an die Mutagenese sollten die Tet-Regulatorregionen bezüglich der Besetzung mit Repressor in vitro charakterisiert werden. Durch Konstruktion von Gen- und Operonfusionen sollte dann der Einfluß der einzelnen Repressor-Operator Komplexe auf die Regulation der beiden Gene tetA und tetR in vivo untersucht werden.

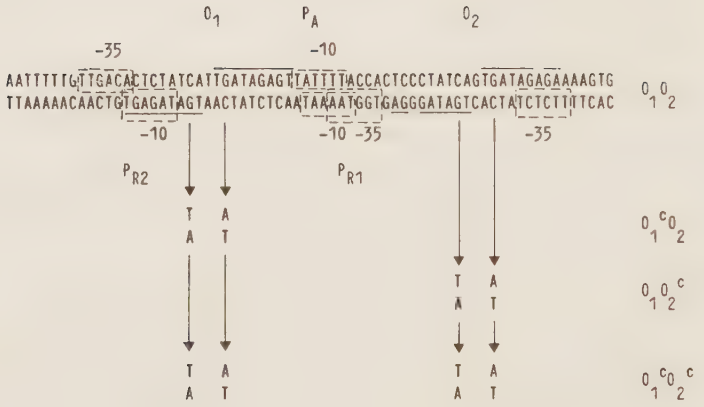


Abb. 4.17: Die Sequenz der tet-Kontrollregion und die eingeführten Mutationen. Die Operatoren O_1 und O_2 sind durch Linien über und unter der palindromischen Sequenz gekennzeichnet. Die Basenpaaraustausche der am rechten Rand benannten Mutanten sind unterhalb der Sequenz dargestellt. Die -10 und -35 Regionen der drei Promotoren sind eingerahmt. Die Benennung der Promotoren ist über bzw. unter der jeweiligen -10 Region angegeben.

4.3.1 Gerichtete Mutagenes der Tn10-tet-Regulatorregion

Die gerichtete Mutagenese wurde in Zusammenarbeit mit Dr. L. Wray durchgeführt. Ziel der Mutagenese war es, die in Abb. 4.17 dargestellten Mutationen in die beiden Operatoren O_1 und O_2 einzuführen. Die Mutante $O_1{}^cO_2$ trägt zwei Punktmutationen im Operator O_1, die Mutante $O_1O_2{}^c$ die entsprechenden Mutationen im Operator O_2. Bei der Mutante $O_1{}^cO_2{}^c$ wurden die Punktmutationen in beide Operatoren eingeführt.

Als Quelle für die tet-Regulatorregion wurde der M13-Phage mWH7 verwendet (Tab. 3.2). mWH7 enthält auf einem 140 bp BamHI-Fragment, dessen Sequenz in Abb. 4.18 dargestellt ist, die komplette tet-Regulatorregion (L. Wray, persönliche Mitteilung). Die Sequenz des Fragments wurde durch Dideoxisequenzierung verifiziert.

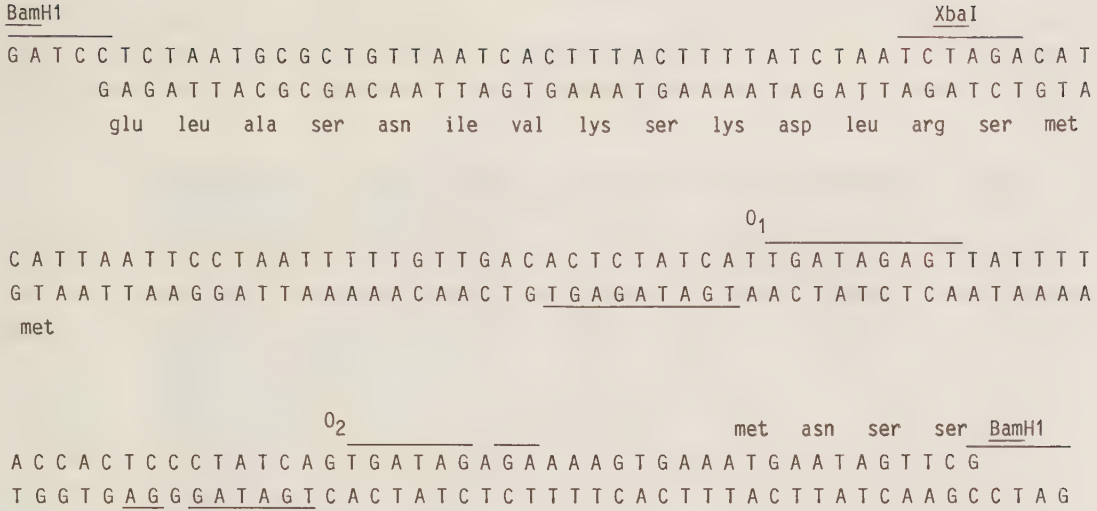


Abb. 4.18: Die Sequenz des 140 bp-BamHI Fragments. Die Operatoren O_1 und O_2 sind durch Linien über und unter der palindromischen Sequenz gekennzeichnet. Der Beginn der Leseraster des tetA-Gens nach rechts bzw. des tetR-Gens nach links ist durch die Aminosäuresequenz über bzw. unter der Sequenz dargestellt.

mWH7 wurde mit BamHI restringiert und das 140 bp BamHI-Fragment wurde durch Elution aus einem 5%igen Polyacrylamidgel isoliert. Es wurde für die Mutagenese in die BamHI-Stelle von M13mp9 (Messing, 1983) insertiert. Ein rekombinanter Phage, der das Fragment in der in Abb. 4.19 dargestellten Orientierug enthält, wurde weiterverwendet. Er wird im folgenden mit mWH460 bezeichnet.

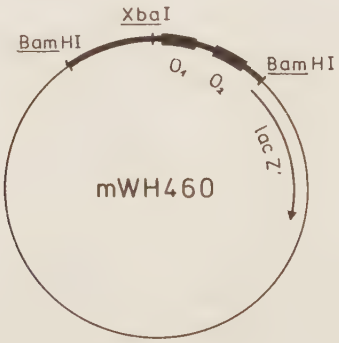


Abb. 4.19: Orientierung des in die BamHI-Stelle von M13 mp9 insertierten 140 bp BamHI-Fragments. Der rekombinante Phage wurde mit mWH460 bezeichnet.

Die Mutagenese wurde nach Kramer et al. (1984) durchgeführt. Folgende Oligonukleotide wurden verwendet:

Operator	Oligonukleotid
O_1	5' G T A A A A T A A C T C T A T **T** A A T **A** A T A G A G T G 3'
O_2	5' C T T T T C T C T A T **T** A C T **A** A T A G G G A G 3'

Die fettgedruckten Nukleotide kennzeichnen die Stellen, an denen die Mutation erfolgte. Im Anschluß an die Mutagenese wurden die Kandidaten durch eine T-spezifische Dideoxisequenzierreaktion analysiert.

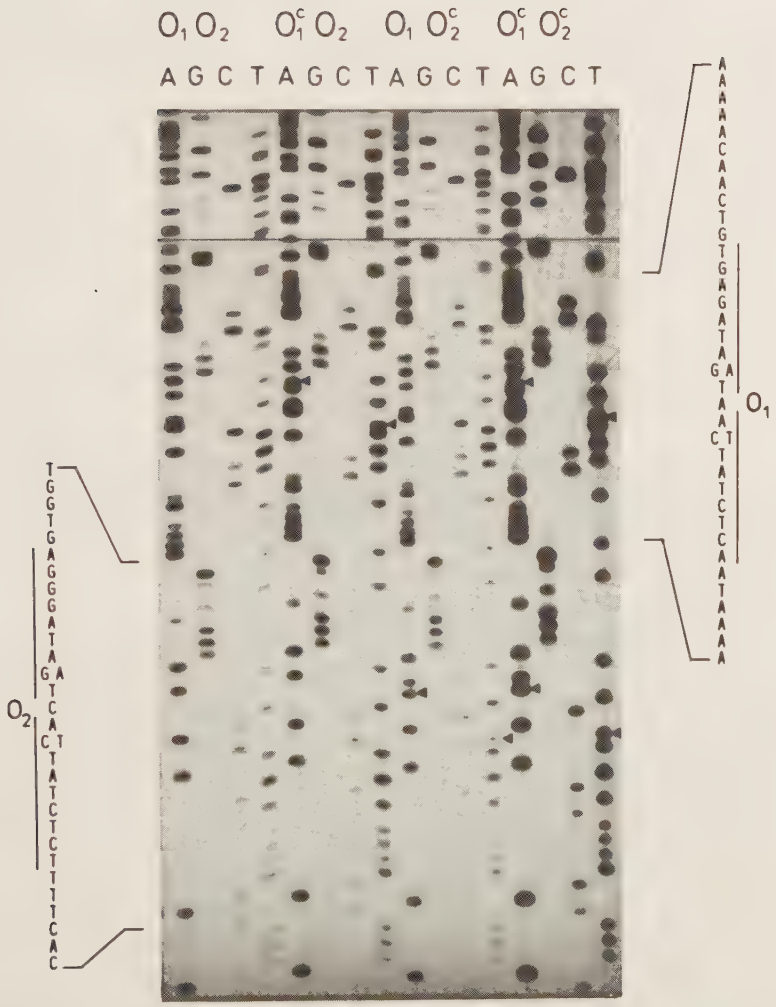


Abb. 4.20: Sequenzierung der Operatormutanten. Die Nukleotidsequenz ist am rechten und linken Rand angegeben. Die Operatoren sind durch Linien neben der Sequenz dargestellt. An Position ± 2 der Operatoren sind jeweils die beiden möglichen Nukleotide angegeben. Die Unterschiede zur Wildtypsequenz (O_1O_2) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Bei der Mutation des Operators O_1 waren 7 von 9 Kandidaten positiv, bei der Mutation von O_2 einer von 8 Kandidaten. Bei der gleichzeitigen Mutation mit beiden Oligonukleotiden waren unter 19 Kandidaten zwei O_1^C-Mutanten, eine O_2^C-Mutante und 16 $O_1^C O_2^C$-Mutanten.

Jeweils ein Kandidat wurde komplett sequenziert. In Abb. 4.20 sind die Sequenzen der 4 tet-Operatorregionen mit den jeweiligen Basenpaaraustauschen dargestellt. Die drei M13 mp9-Derivate mit den mutierten Operatorregionen wurden mit mWH461 ($O_1^C O_2$), mWH462 ($O_1 O_2^C$) und mWH463 ($O_1^C O_2^C$) bezeichnet.

4.3.2 Bindung des Tet-Repressors an die mutierten Regulatorregionen: DNaseI-Schutzexperimente

Mit Hilfe von DNaseI-Schutzexperimenten sollte gezeigt werden, ob noch eine spezifische Bindung des Repressors an die O^C-Mutanten nachweisbar ist. Die Bindekonstante der Repressor-O^C Komplexe sollte in diesem Fall bestimmt und eine mögliche Kooperativität der benachbarten Komplexe quantitativ untersucht werden.

Als Ausgangsmaterial für die Schutzexperimente wurden die Plasmide pWH481 ($O_1^C O_2$), pWH482 ($O_1 O_2^C$) und pWH483 ($O_1^C O_2^C$) verwendet. Die Konstruktion dieser Plasmide wird in Kap. 4.3.5 beschrieben. Die Plasmide tragen das 140 bp BamHI-Fragment mit der jeweiligen mutierten tet-Kontrollregion, insertiert in die BamHI Stelle eines Polylinkers. In Abb. 4.21 ist exemplarisch das Plasmid pWH481 mit der $O_1^C O_2$-tet-Kontrollregion dargestellt.

Die Plasmide wurden mit HindIII linearisiert und durch Phosphorylierung mit γ-^{32}P-ATP an den 5'-Enden radioaktiv markiert. Anschließend wurde die DNA mit SmaI restringiert, so daß ein 202 bp langes Fragment entsteht, das eine radioaktive Markierung an einem Ende trägt. Die HindIII-SmaI-Fragmente wurden durch Elution aus einem 5%igen Polyacrylamidgel vom Vektor abgetrennt und für die DNaseI-Schutzexperimente eingesetzt.

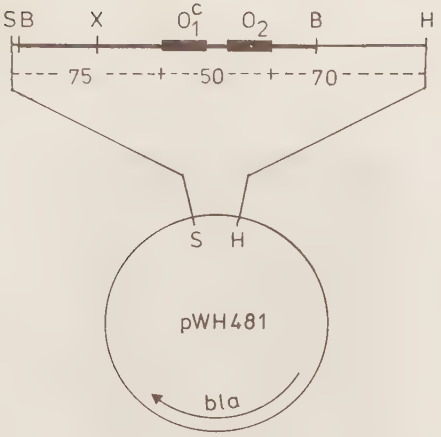


Abb. 4.21: Darstellung des Plasmids pWH481. S: SmaI; B: BamHI; H: HindIII; X: XbaI. Die Abstände zwischen den Operatoren und den Enden des für die Schutzexperimente eingesetzten SmaI/HindIII Fragments sind in Basenpaaren angegeben.

Die Konzentration der DNA betrug 7 x 10^{-10} M. Die DNA wurde mit steigenden Mengen an Repressor titriert. Die jeweiligen Repressorüberschüsse sind in der Legende von Abb. 4.22 angegeben.

Teil A der Abbildung zeigt das Experiment mit der $O_1^C O_2$-Operator-DNA. Stöchiometrische Repressorkonzentrationen führen zu einer Besetzung des Operators O_2 während der mutierte Operator O_1^C unbesetzt bleibt (Spur 4). Bei einer 10-20 fach höheren Repressorkonzentration wird auch O_1^C spezifisch mit Repressor besetzt (Spur 6-7).

In Teil B der Abbildung ist das entsprechende Experiment für die $O_1 O_2^C$-Mutante dargestellt. Auch hier bindet der Repressor bei einer stöchiometrischen Konzentration selektiv an den unmutierten Operator O_1 (Spur 4). O_2^C wird bei einer 10-20 fach höheren Repressorkonzentration spezifisch besetzt (Spur 6-7). Die Repressorkonzentrationen für eine halbmaximale Besetzung von O_1^C und O_2^C sind also gleich.

Teil C der Abbildung zeigt die Titration der $O_1^C O_2^C$-Doppelmutante. Bei stöchiometrischen Repressorkonzentrationen sind beide Operatoren unbesetzt (Spur 4). Beide Operatoren werden bei einer 20 fach höheren Repressorkonzentration gleichzeitig besetzt (Spur 7).

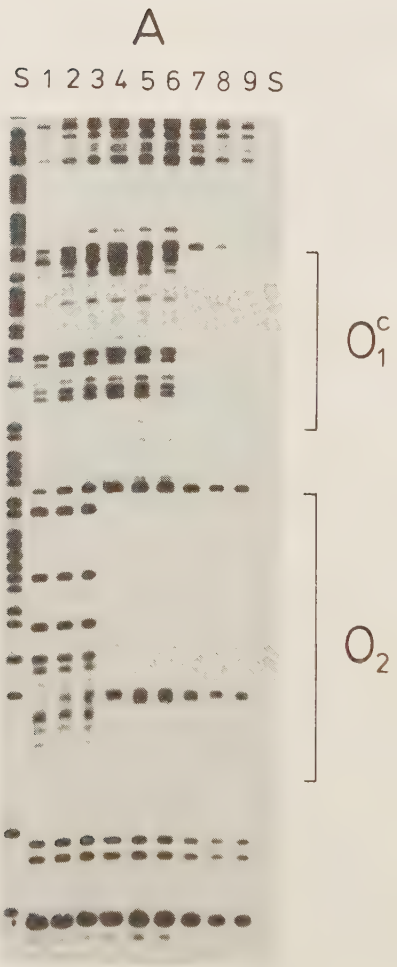


Abb. 4.22 A: DNaseI-Schutzexperiment mit der $O_1{}^cO_2$-Mutante: Spur S: G+A-spezifische Sequenzierreaktion nach Maxam und Gilbert als Längenstandard. Spur 1: DNA ohne Repressor; Spur 2: 0,4 fach-; Spur 3: 0,8 fach-; Spur 4: 2 fach-; Spur 5: 8 fach-; Spur 6: 20 fach-; Spur 7: 40 fach-; Spur 8: 100 fach-; Spur 9: 200 fach molarer Überschuß an Repressor über DNA-Fragment. Die geschützten Bereiche sind durch die Einrahmungen am rechten Rand gekennzeichnet.

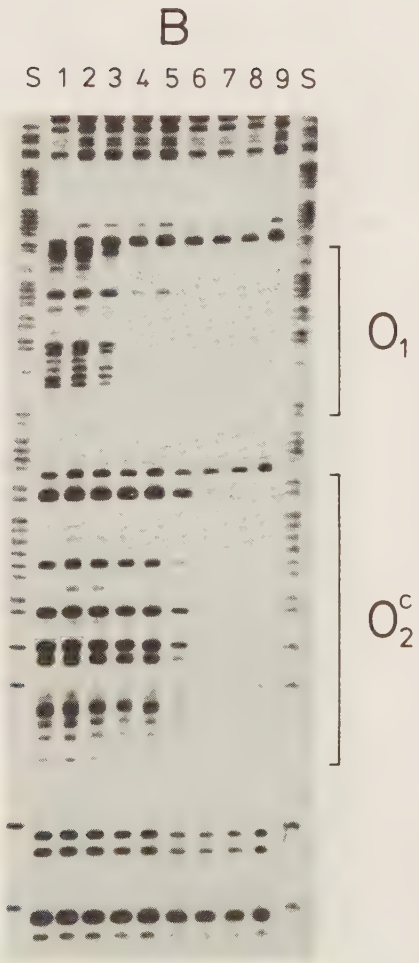


Abb. 4.22 B: DNaseI-Schutzexperiment mit der $O_1O_2^c$-Mutante: Die Repressorkonzentrationen der Spuren 1-9 sind wie in Abb. 4.22 A angegeben. Spur S: G+A-spezifische Sequenzierreaktion nach Maxam und Gilbert als Längenstandard. Die geschützten Bereiche sind durch die Einrahmungen am rechten Rand gekennzeichnet.

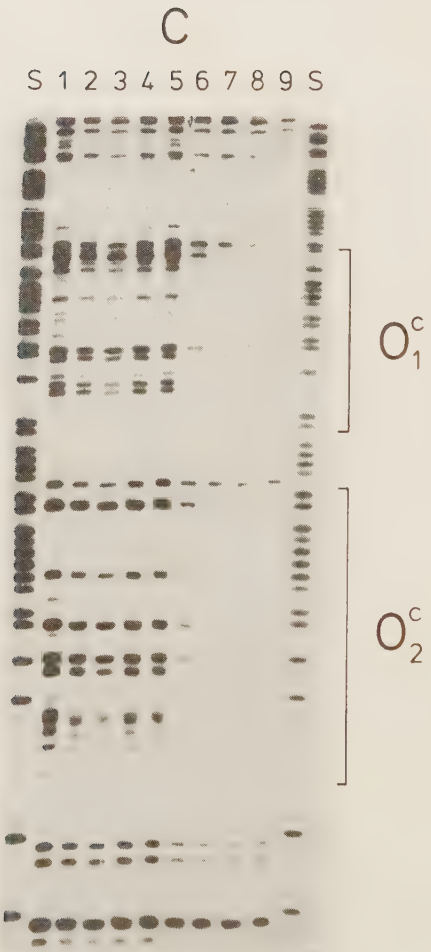


Abb. 4.22 C: DNaseI-Schutzexperiment mit der $O_1^cO_2^c$-Mutante: Die Repressorkonzentrationen der Spuren 1-9 sind wie in Abb. 4.22 A angegeben. Spur S: G+A-spezifische Sequenzierreaktion nach Maxam und Gilbert als Längenstandard. Die geschützten Bereiche sind durch die Einrahmungen am rechten Rand gekennzeichnet.

Die gleiche Repressorkonzentration ist also nötig, um sowohl die beiden mutierten Operatoren als auch einen mutierten Operator in Nachbarschaft zu einem Wildtyp-Operator zu besetzen. Es gibt demnach keine kooperativen Effekte durch den benachbarten Repressor-DNA Komplex. Die Ausdehnung des geschützten Bereichs auf der DNA unterscheidet sich für die Wildtyp- und Mutanten-Komplexe nicht. Die Mutation der beiden Basenpaare an Position $\pm$ 2 bewirkt also keinen durch DNaseI-Schutz detektierbaren strukturellen Unterschied der Komplexe.

Die in Abb. 4.22 dargestellten Titrationen wurden jeweils zweimal wiederholt und die Bindekonstante der Repressor-O^c Komplexe wurden aus der zur halbmaximalen Besetzung der mutierten Operatoren benötigten Repressorkonzentration bestimmt. Das Ergebnis ist in Tab. 4.5 dargestellt. Die Bindekonstanten liegen im Bereich von 10^7-10^8 M^{-1}. Damit ist die Bindung des Repressors an die Operatormutanten um mindestens 3 Zehnerpotenzen schwächer als die an die Wildtyp-Operatoren (Kleinschmidt et al., im Druck).

Tabelle 4.5: Bindekonstanten der Repressor-Operatormutanten Komplexe

Experiment	Operatormutante	K (M^{-1})
1	$O_1^cO_2$	$4{,}5 \times 10^7$
2	$O_1^cO_2$	$1{,}3 \times 10^7$
1	$O_1O_2^c$	$4{,}5 \times 10^7$
2	$O_1O_2^c$	$7{,}5 \times 10^7$
1	$O_1^cO_2^c$	$5{,}5 \times 10^7$
2	$O_1^cO_2^c$	$5{,}5 \times 10^7$

4.3.3 Konstruktion von chromosomalen tet-lacZ Translationsfusionen

Verschiedene Gen- und Operonfusionen wurden konstruiert, um den Einfluß der singulären Besetzung der beiden Operatoren auf die Aktivität der tetA- und tetR Promotoren zu untersuchen.

Zunächst wurden Genfusionen von tetA und tetR an das lacZ-Gen auf

einem M13 Vektor konstruiert und diese durch homologe Rekombination auf einen λ -Phagen übertragen. Die rekombinanten λ-Phagen wurden in das E.coli Chromosom integriert und die Expression der tet-lac Genfusionen in den λ -lysogenen E.coli-Stämmen wurde gemessen.

4.3.3.1 Konstruktion der tet-lacZ-Translationsfusionen in mWH6

Als Vektor für die Konstruktion der tet-lacZ-Translationsfusionen wurde der Vektor mWH6 verwendet (Abb. 4.23, Tab. 3.2).

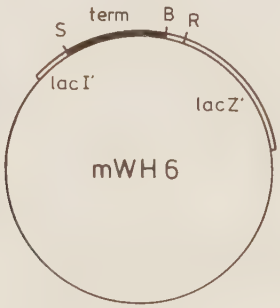


Abb. 4.23 : Der Vektor mWH6. S: SalI; B: BamHI; R: EcoRI; term: SalI/BamHI-Terminatorfragment

Der Vektor ist ein M13 mp11-Derivat (Messing, 1983). Das SalI/NarI-Fragment von M13 mp11 wurde unter Regeneration der SalI Stelle deletiert. Auf diesem Fragment befindet sich der lac-Promotor. Zwischen die BamHI und SalI-Stelle wurde ein 260 bp-Fragment insertiert, das zwei Terminatorstrukturen trägt (Ohmori und Tomizawa, 1979). Dadurch sollte verhindert werden, daß durch die Insertion der divergenten tet-Promotoren eine Transkription in Richtung auf den Replikationsursprung von M13 zur Instabilität der Konstruktion führt. Der Vektor mWH6 ist lac$^-$. Durch Insertion der tet-BamHI-Fragmente (Abb. 4.18) in die BamHI-Stelle von mWH6 entsteht in beiden Orientierungen eine Lese-

rasterfusion (Abb. 4.24).

Die Tet-Regulatorfragmente wurden als BamHI-Fragmente aus den M13-Vektoren mWH460, mWH461, mWH462 und mWH463 isoliert (Kap. 4.3.1). Je 50 µg DNA wurden mit BamHI verdaut und die 140 bp-Fragmente aus 5%igen Polyacrylamidgelen eluiert. Die Fragmente wurden mit 0,2 µg BamHI-linearisiertem mWH6 ligiert und auf E.coli BMH71-18 transformiert. Ca. 50% der Transformanden waren ß-Galaktosidase positiv. Jeweils 10 blaue Plaques wurden vereinzelt und die RF-DNA durch Minipräparation isoliert.

Mit der DNA wurde eine XbaI-EcoRI Verdauung durchgeführt und die Verdauungsprodukte auf einem 5%igen Polyacrylamidgel analysiert. Die XbaI-Stelle teilt das 140 bp BamHI-Fragment in ein 40 bp- und ein 100 bp-Fragment. Die EcoI-Stelle befindet sich am Beginn des ß-Galaktosidase-Gens. Bei einer tetA-lacZ Fusion muß ein 120 bp großes XbaI-EcoRI Fragment entstehen, im Fall einer tetR-lacZ Fusion ein 60 bp-Fragment (Abb. 4.24). Beide Orientierungen wurden für alle vier tet-Fragmente gefunden.

Je ein Phage mit der korrekten Struktur wurde vermehrt und das insertierte Fragment wurde sequenziert. Alle acht Phagen hatten die korrekte Sequenz. Die Autoradiographien der Sequenzierungen sind in Anhang 1 dargestellt.

Die Phagen wurden wie folgt benannt:

Phage	Fusion	Operatorregion
mWH480	tetA-lacZ	O_1O_2
mWH481	- " -	$O_1{}^cO_2$
mWH482	- " -	$O_1O_2{}^c$
mWH483	- " -	$O_1{}^cO_2{}^c$
mWH490	tetR-lacZ	O_1O_2
mWH491	- " -	$O_1{}^cO_2$
mWH492	- " -	$O_1O_2{}^c$
mWH493	- " -	$O_1{}^cO_2{}^c$

Die DNA-Sequenz der Fusionsstelle zwischen tetA und lacZ bzw. tetR und lacZ ist in Abb.4.24 dargestellt.

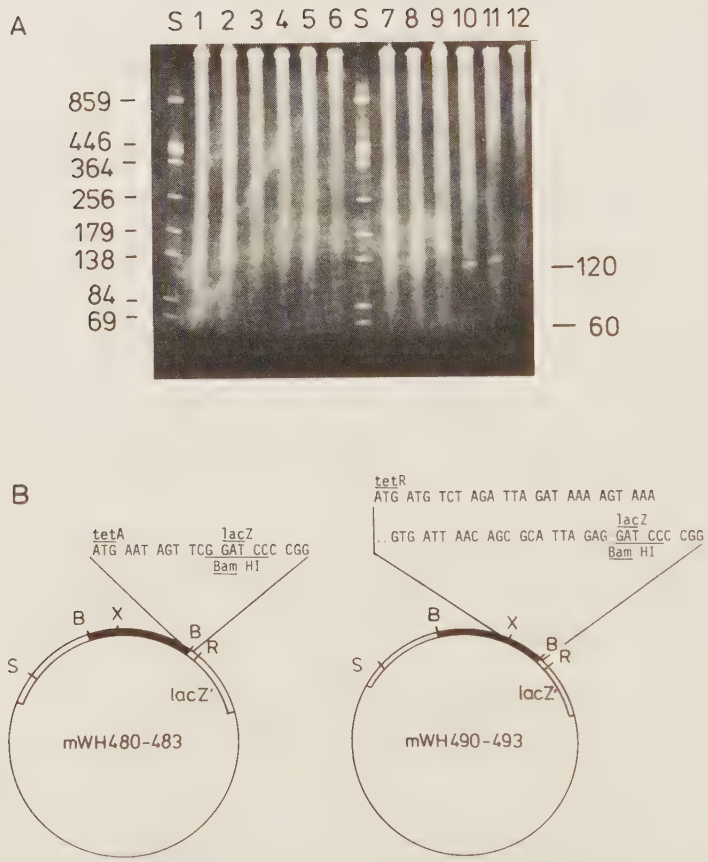


Abb. 4.24: Konstruktion der M13-Phagen mWH480-483 und mWH490-493. Teil A:Analyse der Orientierung des 140 bp BamHI Fragments in 12 Kandidaten der Transformation. Spur S: Längenstandard: pVH27/EcoRI/HaeIII. Spur 1-12: XbaI/EcoRI-Verdauung von DNA aus M13-Minipräparationen. Spur 1, 7-11: tetA-lacZ Orientierung; Spur 2-6, 12: tetR-lacZ-Orientierung. Die Länge der Fragmente ist in Basenpaaren angegeben. Teil B: Karte der Vektoren mWH480-483 und mWH490-493. Die Sequenz der tetA-lacZ bzw. tetR-lacZ Fusionsstelle ist angegeben. S: SalI; B: BamHI; R: EcoRI; X: XbaI.

In beiden Fällen entsteht eine funktionale ß-Galaktosidase, erkennbar an der Blaufärbung der M13-Plaques auf X-Gal-Indikatorplatten.

4.3.3.2 Rekombination der tet-lacZ-Fusionen auf λ plac5 · T743

Die tet-lacZ Fusionen wurden durch homologe Rekombinationen auf den Phagen λ plac5 · T743 übertragen (Abb. 4.25). λplac5 · T743 trägt das komplette lac-Operon bis auf einen Teil des lacI-Gens (Ippen et al., 1971). Der lac-Promotor ist durch die Punktmutation T743 in der -10 Region inaktiviert, der Phage ist also phänotypisch Lac$^-$ (Yu und Reznikoff, 1984). Durch homologe Rekombination zwischen λ plac5 · T743 und den M13-Derivaten mWH480-483 und mWH490-493 sollten λ Phagen entstehen, die lac$^+$ sind und bei denen die Expression der ß-Galaktosidase unter der Kontrolle der tet-Regulatorregion steht (Abb. 4.25).

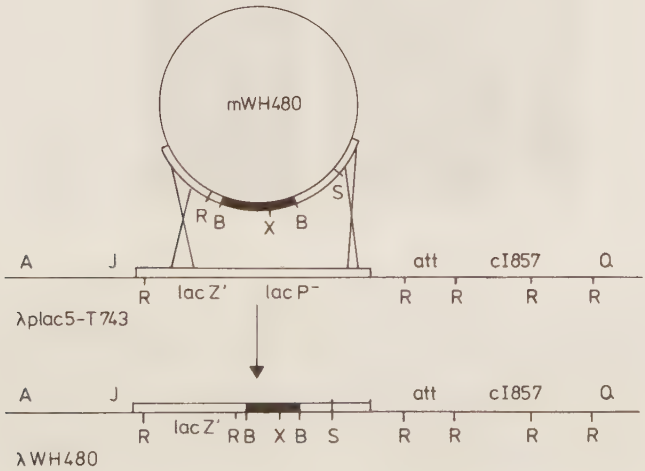


Abb. 4.25: Homologe Rekombination zwischen mWH480 und λ plac 5-T743. Die Darstellung der einzelnen Abschnitte des λ -Genoms ist nicht maßstabgetreu. Durch Rekombination zwischen homologen Bereichen im lacZ'-Gen und lacI-Gen wird die tet-Kontrollregion auf λ übertragen. Dadurch gelangt eine neue EcoRI-Stelle auf λ. R: EcoRI; B: BamHI; X: XbaI; S: SalI.

Die Rekombination wurde wie in Kapitel 3.9.4 beschrieben durchgeführt. Die Rekombinationsrate betrug 10^{-3} - 10^{-4}.

Rekombinante λ Phagen wurden vermehrt und die λ -DNA durch Minipräparation isoliert. Die DNA wurde mit EcoRI verdaut und die Verdauungsprodukte wurden auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Nach erfolgreicher Rekombination muß eine zusätzliche EcoRI-Stelle auf dem λ -Phagen existieren, die aus dem Polylinker von M13 mp11 stammt (s. Abb. 4.25). Abbildung 4.26 zeigt, daß im Vergleich zu λplac5 · T743 ein EcoRI-Fragment verschwindet und dafür zwei kürzere Fragmente entstehen. Dies entspricht der korrekten Struktur.

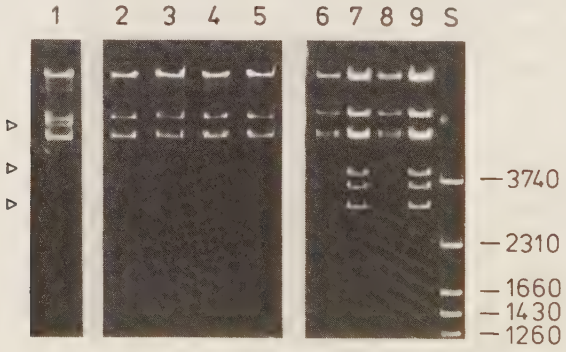


Abb. 4.26: Analyse der rekombinanten λ -Phagen. Es ist eine EcoRI-Verdauung der DNA aus λ -Minipräparationen gezeigt. Spur 1: λ plac 5 · T743; Spur 2: λ WH490; Spur 3: λWH491; Spur 4: λ WH492; Spur 5: λWH493; Spur 6: λ WH480; Spur 7: λ WH481; Spur 8: λ WH482; Spur 9: λ WH483; Spur S: Längenstandard. Die Länge der Fragmente ist in Basenpaaren angegeben. Das EcoRI-Fragment von λ plac 5 · T743, auf dem die Rekombination stattfindet und die beiden durch die zusätzliche EcoRI-Stelle auf den Rekombinanten entstehenden Fragmente sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die λ -Phagen wurden entsprechend zu den homologen M13-Phagen (Kap. 4.3.3.1) λWH480-483 und λWH490-493 genannt. Die rekombinanten λ -Phagen wurden in den lysogenen Zustand überführt. Von je drei λ -lysogenen Stämmen wurden die ß-Galaktosidaseaktivitäten gemessen, um

doppel- von einfachlysogenen Stämmen unterscheiden zu können. Im Fall einer doppelten Integration des λ-Phagen im Chromosom ist die ß-Galaktosidaseaktivität des Stammes 1,5 - 2 mal höher als im Fall einer einfachen Integration. In Tabelle 4.6 sind die Ergebnisse dargestellt. Die gekennzeichneten einfachlysogenen Stämme wurden für die weiteren Messungen eingesetzt. Die Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Fusionen werden im folgenden Kapitel diskutiert.

Tabelle 4.6: ß-Galaktosidaseaktivität verschiedener λ -lysogener Stämme. Die durch Fettdruck der ß-Galaktosidaseaktivität gekennzeichneten einfach lysogenen Stämme wurden weiterverwendet.

Konstruktion	Nr.	ß-Galaktosidase Aktivität
tetA O_1O_2	1	**33 ± 1**
	2	50 ± 11
	3	130 ± 34
tetA $O_1{}^cO_2$	1	**39 ± 9**
	2	52 ± 4
	3	109 ± 25
tetA $O_1O_2{}^c$	1	**1598 ± 50**
	2	1597 ± 11
	3	1600 ±220
tetA $O_1{}^cO_2{}^c$	1	**1637 ± 43**
	2	1676 ±107
tetR O_1O_2	1	**1116 ± 7**
	2	2180 ±117
	3	1162 ±120
tetR $O_1{}^cO_2$	1	520 ± 18
	2	506 ± 15
	3	**483 ± 13**
tetR $O_1O_2{}^c$	1	628 ± 18
	2	824 ±185
	3	**546 ± 50**
tetR $O_1{}^cO_2{}^c$	1	204 ± 19
	2	226 ± 24
	3	**133 ± 20**

4.3.3.3 Expression und Regulation der tet-lacZ-Translationsfusionen

Die Regulation der Expression der Wildtyp-Genfusionen wurde durch Zugabe des Tet-Repressors in trans untersucht. Die λ-lysogenen Stämme wurden hierzu mit den beiden Plasmiden pRT241 und pRT240 transformiert, die unterschiedliche Mengen an Tet-Repressor exprimieren (Wray et al., 1983). Transformanden wurden auf die Anwesenheit der Plasmide durch Schnellpräparation und Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Anschließend wurde die ß-Galaktosidaseaktivität der Stämme mit und ohne Plasmid gemessen. Tabelle 4.7 zeigt die ß-Galaktosidaseaktivität der WT-tetA-lacZ und der WT-tetR-lacZ-Fusion.

Tabelle 4.7: Regulation der Expression der tetA-lacZ und tetR-lacZ WT-Translationsfusionen.

E.coli Stamm	Fusion	Plasmid	ß-Galaktosidase Akt.	Standard abweichung	% Akt.	Standard-abweichung
CSH26::λWH480	tetA-lacZ	---	48,5	4,1	100	8,5
CSH26::λWH480	tetA-lacZ	pRT241	3,2	0,3	6,6	0,6
CSH26::λWH480	tetA-lacZ	pRT240	0,1	---	0,2	---
CSH26::λWH490	tetR-lacZ	---	790	55	100	7,0
CSH26::λWH490	tetR-lacZ	pRT241	823	245	100	29,8
CSH26::λWH490	tetR-lacZ	pRT240	923	36	100	3,9

Die tetA-lacZ-Fusion wird durch Repressor in trans reguliert. Durch pRT240, das eine größere Menge an Repressor exprimiert, wird die Genfusion stärker reprimiert als durch pRT241. Die tetR-lacZ-Fusion wird wider Erwarten nicht durch Tet-Repressor reprimiert. Dies steht im Widerspruch zu bereits bekannten Daten, die zeigen, daß die Transkription von tetR durch den Tet-Repressor reprimiert wird (Bertrand et al., 1984; Hillen et al., 1984).

Um zu kontrollieren, ob es sich nicht um einen Artefakt handelt, der bei der Rekombination auf λ entstanden ist, wurden folgende Experimente durchgeführt: Die Rekombination zwischen mWH490 und λ plac5 · T743 wurde wiederholt. Zehn verschiedene rekombinante λ-Phagen wurden in den lysogenen Zustand überführt. Die λ-lysogenen Stämme wurden mit

pRT240 transformiert und die ß-Galaktosidaseaktivität der Stämme mit und ohne Repressor wurde gemessen. Die Expression war in allen Fällen die gleiche wie in Tabelle 4.7. Um zu überprüfen, ob λ WH490 die korrekte tet-Regulatorregion noch enthält, wurde die aus einer λ - Schnellpräparation gewonnene DNA mit BamHI verdaut und mit BamHI-linearisiertem mWH6 ligiert. Der Ansatz wurde auf E.coli BMH71-18 transformiert. Ca. 2% der erhaltenen Plaques waren blau, d.h. die Phagen hatten ein Promotor-Fragment insertiert. Ein Phage wurde sequenziert und enthielt das korrekte 140 bp-tet-Regulator-Fragment.

Da kein Fehler bei der Konstruktion der tetR-lacZ-Fusion gefunden werden konnte und die fehlende Regulierbarkeit unverstanden blieb, wurde die Regulation der tetR-Promotoren in einer neuen, auf anderem Weg konstruierten Fusion untersucht (Kap. 4.3.5).

Um die Regulation der tetA-lacZ-Fusionen mit den mutierten Operatoren zu studieren, wurden die entsprechenden λ -lysogenen Stämme mit pRT241 und pRT240 transformiert und die ß-Galaktosidaseaktivität der Konstruktionen mit und ohne Repressor gemessen. Tabelle 4.8 zeigt das Ergebnis der Messung.

Tabelle 4.8: Regulation der Expression der tetA-lacZ Translationsfusionen.

Zeile	E.coli Stamm	Mutante	Plasmid	ß-Galaktosidase Akt.	Standardabweichung	% Akt.	Standardabweichung
1	CSH26::λWH480	O_1O_2	---	74,9	3,4	100	4,5
2			pRT241	10	1,0	13,4	1,3
3			pRT240	0,25	0,13	0,3	0,16
4	CSH26::λWH481	$O_1{}^cO_2$	---	81,5	11,8	100	14,5
5			pRT241	16,9	1,2	20,7	1,5
6			pRT240	0,4	0,03	0,5	0,04
7	CSH26::λWH482	$O_1O_2{}^c$	---	1902	66,0	100	3,5
8			pRT241	670	20,1	35	1,1
9			pRT240	13,1	0,5	0,7	0,03
10	CSH26::λWH483	$O_1{}^cO_2{}^c$	---	2066	94,0	100	4,6
11			pRT241	1903	6,1	100	0,3
12			pRT240	1613	229	78	11,1

Die unreprimierte Expression der vier verschiedenen Stämme ist nicht gleich (Zeile 1,4,7,10). Die Expression der O_2^c-Mutante und der Doppelmutante liegt um den Faktor 20-30 höher als die des Wildtyps und der O_1^c-Mutante. Die beiden Basenpaaraustausche im Operator O_2 haben also außer der Reduktion der Repressorbindung noch einen weiteren Einfluß auf die Expression des tetA-Gens. Da es sich um Translationsfusionen handelt und die Mutationen im transkribierten Bereich von tetA liegen (s. Abb. 2.5 und Abb. 4.17), kann es sich dabei sowohl um einen Transkriptions- als auch um einen Translationseffekt handeln.

Die Zugabe von durch pRT241 exprimiertem Repressor in trans beeinflußt die Expression der Fusion mit der $O_1^cO_2^c$-Mutation kaum (Zeile 10,11). Bei der von pRT241 exprimierten Repressormenge findet also fast keine Bindung an die mutierten Operatoren statt. Die Effekte des Tet-Repressors auf die anderen Fusionen gehen daher auf die Bindung an die unmutierten Operatoren zurück. Sowohl der Wildtyp als auch die beiden Mutanten $O_1^cO_2$ und $O_1O_2^c$ werden durch Tet-Repressor reprimiert (Zeile 2,5,8). Die Repression der Mutanten ist um den Faktor 1,5-2,5 geringer als die der WT-Fusion. Durch die von pRT240 exprimierte Repressormenge werden sowohl der Wildtyp als auch die beiden Einzelmutanten auf unter 1% der Expression reprimiert (Zeile 3,6,9). Auch bei der Doppelmutante kommt es zu einer leichten Repression, die auf die durch die hohe Konzentration hervorgerufene Bindung von Repressor an die mutierten Operatoren schließen läßt (Zeile 12). Sowohl die Bindung des Tet-Repressors an den Operator O_1 als auch an den Operator O_2 interferiert also mit der Transkription von tetA. O_2 bewirkt dabei eine stärkere Repression als O_1.

Da die Regulation des tetR-Gens mit den hier beschriebenen Fusionen nicht untersucht werden konnte, sollten andere, funktionale, d.h. regulierbare tetR-Fusionen konstruiert werden. Um zu klären, ob die O_2^c-Mutation eine Expressionserhöhung auf Translations- oder Transkriptionsebene bewirkt, sollten tetA-Transkriptionsfusionen konstruiert und mit den Translationsfusionen verglichen werden.

Hierzu wurden zwei verschiedene Strategien verwendet. Zum einen wurden λ-Phagen, die tet-lacZ-Transkriptionsfusionen enthielten, konstruiert, so daß nach Integration ins Chromosom die Expression einer einzelnen Kopie pro Zelle gemessen werden konnte (Kap. 4.3.4).

Zum anderen wurde ein Expressionsplasmid verwendet, welches aufgrund der divergenten Anordnung zweier Indikatorgene erlaubte, die Expression der Promotoren von tetA und tetR simultan zu messen (Schneider und Beck, 1986) (Kap. 4.3.5).

4.3.4 Konstruktion von chromosomalen tet-lacZ-Transkriptionsfusionen

Zur Konstruktion von Transkriptionsfusionen der tet-Promotoren an das lacZ-Gen wurde der Vektor pWH407 verwendet (Abb. 4.27). Auf pWH407 befindet sich die trpB-lacZ-Fusion W200 (Yu et al., 1984). Die Translation der ß-Galaktosidase beginnt in dieser Fusion am ATG-Startcodon des lacZ-Gens. Die Translation des trpB-Gens terminiert bei Aminosäure 15 der ß-Galaktosidase (s. Abb. 4.27). Am 5' Ende des trpB-Gens befindet sich der Polylinker aus M13 mp8 (Messing, 1983). Überlappend mit der HindIII-Stelle beginnt das Leseraster von trpB mit Aminosäure 31 (Abb. 4.27) (Yanofsky et al., 1981). Durch Klonierung von Promotorfragmenten in den Polylinker kommt es zu einer Transkriptionsfusion an das lacZ-Gen, dessen Translation ca. 1000 bp in 3'-Richtung von der Promotorregion startet.

Der Phage λ RZ11 trägt einen zu pWH407 homologen Bereich, der vom ß-Laktamase-Gen bis in das ß-Galaktosidase-Gen reicht (Yu und Reznikoff, 1984). λ RZ11 unterscheidet sich in diesem Bereich von pWH407 dadurch, daß er anstelle des Polylinkers aus M13 mp8 ein 360 bp langes EcoRI-HindIII-Fragment trägt (Abb. 4.27). Auf diesem Fragment befindet sich kein Promotor, so daß λ RZ11 lac$^-$ ist. Durch homologe Rekombination von pWH407-Derivaten mit λ RZ11 können lacZ-Fusionen auf den λ Phagen übertragen und mit diesem in das E.coli Chromosom integriert werden.

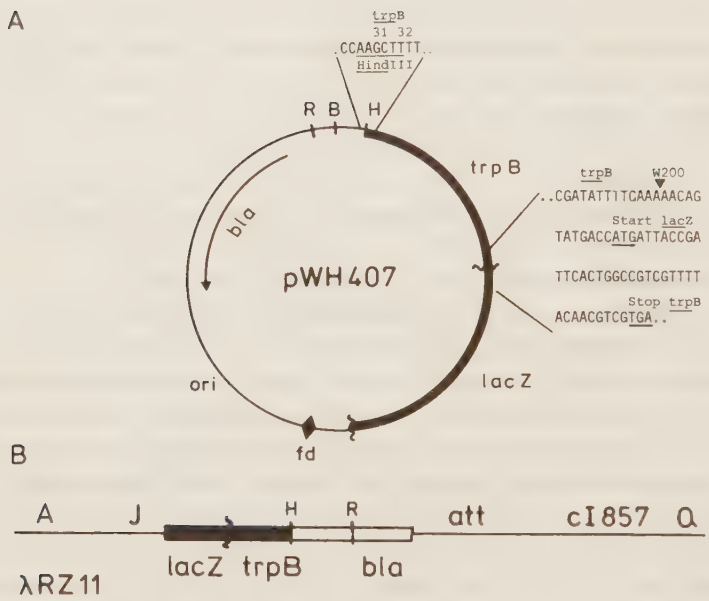


Abb. 4.27: Teil A: Der Vektor pWH407. Die Nukleotidsequenzen des Beginns des trpB Leserasters und der Fusionsstelle zwischen trpB und lacZ sind dargestellt. Die Ziffern über der Sequenz bezeichnen die Aminosäuren des trpB Leserasters. Das Startcodon von lacZ und das Stopcodon von trpB sind unterstrichen. Die W200-Fusionsstelle ist durch einen Pfeil markiert. R: EcoRI; B: BamHI; H: HindIII; fd: fd-Terminator; ori: Replikationsursprung. Teil B: Der Phage λ RZ11. Die Darstellung der einzelnen Abschnitte des λ -Genoms ist nicht maßstabgetreu. Die Homologie zu pWH407 reicht vom B-Galaktosidasegen bis in das B-Laktamasegen. Das 360 bp EcoRI/HindIII-Fragment von λ RZ11 wurde auf pWH407 durch den Polylinker aus M13 mp8 ersetzt. R: EcoRI; H: HindIII.

4.3.4.1 Konstruktion der Transkriptionsfusionen in pWH407

Die tet-Regulatorregion und die Mutanten wurden als 140 bp lange BamHI-Fragmente in die BamHI-Stelle von pWH407 insertiert. Als Quelle für die BamHI-Fragmente wurden die Vektoren mWH460, mWH461, mWH462 und mWH463 verwendet (Kap. 4.3.1). Die 140 bp-Fragmente wurden durch Elution aus einem 5%igen Polyacrylamidgel isoliert und mit ca. 0,1 µg

BamHI-linearisiertem pWH407 ligiert. Die Ansätze wurden auf E.coli CSH26 transformiert und die Transformanden auf LB-Platten mit Ampicillin und X-Gal ausplattiert (Kap. 3.4). Es wurden zwischen 6% und 50% ß-Galaktosidase-positive Transformanden erhalten. Jeweils sechs Kandidaten wurden analysiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Schnellpräparation isoliert und mit XbaI und HindIII restringiert. Die Verdauungsprodukte wurden auf einem 5%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Bei einer Insertion des Fragments in tetA-lacZ-Orientierung muß ein 120 bp langes XbaI-HindIII Fragment entstehen, bei tetR-lacZ Orientierung ein 60 bp langes Fragment (Abb. 4.28). Alle analysierten Plasmide hatten das Fragent in tetA-lacZ Orientierung insertiert. Einige enthielten Doppelinsertionen.

Jeweils ein Plasmid mit tetA-lacZ-Fusion wurde präpariert und durch Restriktionsverdauung analysiert. Die Insertion des 140 bp Fragments wurde durch eine BamHI-Verdauung verifiziert. Die Orientierung der Fragmente und die Tatsache, daß es sich um Einfachinsertionen handelt, wurden durch eine XbaI-HindIII Verdauung gezeigt, bei der das 120 bp XbaI-HindIII Fragment entsteht. Eine HaeIII Verdauung zeigte ebenfalls die Insertion des Fragments sowie die Intaktheit des Vektors. Abbildung 4.28 zeigt die Restriktionsverdauungen sowie die Konstruktion und Benennung der vier Plasmide.

Da durch die Klonierung der BamHI-Fragmente keine Insertion in tetR-lacZ Orientierung erhalten worden war, wurde versucht, diese durch eine gerichtete Klonierung zu erreichen. Die tet-Regulatorregionen wurden als EcoRI-HindIII Fragmente aus den Vektoren mWH460, mWH461, mWH462 und mWH463 (Kap. 4.3.1) isoliert. Durch Insertion dieser Fragmente zwischen die EcoRI und die HindIII Stelle von pWH407 sollte die tetR-lacZ Orientierung erzwungen werden. In mehreren Transformationsansätzen wurden jedoch immer nur weniger als 1% blaue Transformanden erhalten, die sich beim Vereinzeln als instabil erwiesen, verschiedene Kolonieformen hatten und blau-weiß sektorierte Kolonien bildeten. Die tetR-lacZ-Fusionen waren in diesem Vektor also offensichtlich genetisch instabil.

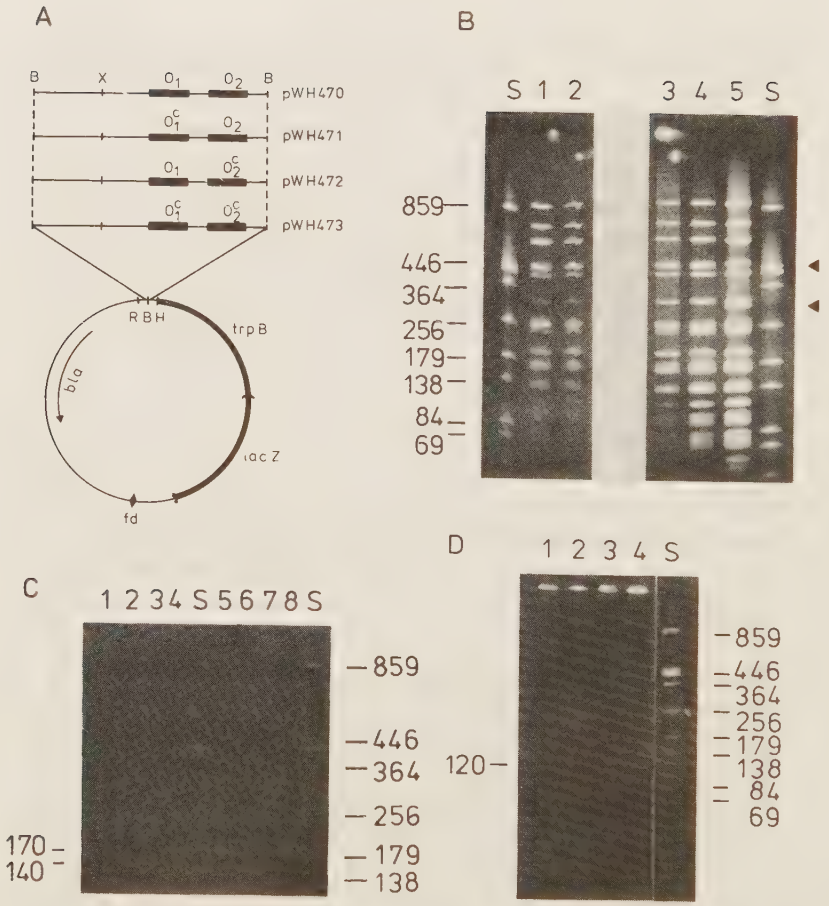


Abb. 4.28: Teil A: Konstruktion der Plasmide pWH470, pWH471, pWH472 und pWH473. B: BamHI; X: XbaI; R: EcoRI; H: HindIII; fd: fd-Terminator. Teil B: HaeIII-Verdauung der rekombinanten Plasmide. Spur 1: pWH470; Spur 2: pWH471; Spur 3: pWH472; Spur 4: pWH473; Spur 5: pWH407; Spur S: Längenstandard pVH27/EcoRI/HaeIII. Die HaeIII-Fragmente, die die Insertion tragen, sowie deren Ausgangsfragment in pWH407 sind durch Pfeile markiert. Teil C: Spur 1-4: BamHI-Verdauung; Spur 5-8: EcoRI/HindIII-Verdauung; Spur 1 und 5: pWH470; Spur 2 und 6: pWH471; Spur 3 und 7: pWH472; Spur 4 und 8: pWH473; Spur S: Längenstandard pVH27/EcoRI/HaeIII. Teil D: XbaI/HindIII-Verdauung: Spur 1: pWH470; Spur 2: pWH471; Spur 3: pWH472; Spur 4: pWH473; Spur S: Längenstandard pVH27/EcoI/HaeIII. Die Längen der Fragmente sind in Basenpaaren angegeben.

4.3.4.2 Rekombination der tetA-lacZ-Transkriptionsfusionen auf λ RZ11

Die tetA-lacZ-Fusionen wurden von den Plasmiden pWH470, pWH471, pWH472 und pWH473 (Abb. 4.28) durch homologe Rekombination auf den Phagen λ RZ11 übertragen. Die Rekombination wurde wie unter Kap. 3.9.5 beschrieben durchgeführt. Die Rekombinationsrate lag bei 10^{-3} - 10^{-4}. Die λ -DNA der Kandidaten wurde durch Minipräparation isoliert. Zur Analyse wurde eine HindIII Verdauung durchgeführt. Durch die Rekombination wird das 3,8 kbp HindIII-Fragment von λ RZ11 um ca. 200 bp kürzer (Abb. 4.29). Dieser Längenunterschied kann auf einem 1%igen Agarosegel nachgewiesen werden. Abbildung 4.29 zeigt den Vergleich von λ RZ11 und den rekombinanten Phagen.

Die λ -Phagen wurden entsprechend den zugehörigen Plasmiden mit λ WH470, λ WH471, λ WH472 und λ WH473 bezeichnet. Es wurden λ-lysogene Stämme in E.coli CSH26 konstruiert. Die ß-Galaktosidaseaktivität von je 3-4 lysogenen Stämmen wurde bestimmt, um einfach- von doppeltintegrierten λ-Phagen zu unterscheiden. Die Ergebnisse sind in Tab. 4.9 dargestellt. Die gekennzeichneten einfachlysogenen Stämme wurden für die weiteren Messungen eingesetzt.

Tabelle 4.9: ß-Galaktosidaseaktivität verschiedener λ -lysogener Stämme. Die durch Fettdruck der ß-Galaktosidaseaktivität gekennzeichneten einfach-lysogenen Stämme wurden weiterverwendet.

Konstruktion	Nr	ß-Galaktosidase Aktivität
tetA-lacZ O_1O_2	1	**107 ± 5**
	2	281 ± 7
	3	128 ± 1
	4	100 ± 6
tetA-lacZ $O_1{}^cO_2$	1	**120 ± 5**
	2	124 ± 3
	3	104 ± 0
tetA-lacZ $O_1O_2{}^c$	1	286 ± 0
	2	280 ± 2
	3	264 ±14
	4	**258 ±10**
tetA-lacZ $O_1{}^cO_2{}^c$	1	**224 ±10**
	2	246 ±11
	3	232 ± 1

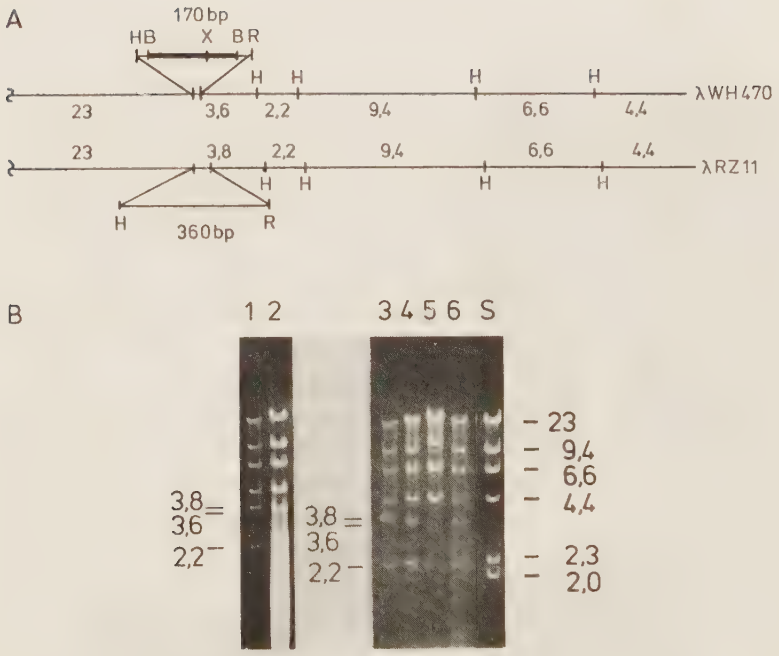


Abb. 4.29: Teil A: Die HindIII-Restriktionskarte der Phagen λRZ11 und λWH470. Die tet-Kontrollregion auf λWH470 und das entsprechende EcoRI-HindIII-Fragment auf λRZ11 sind vergrößert dargestellt. H: HindIII; R: EcoRI; B: BamHI; X: XbaI. Die Länge der Fragmente ist, wenn nicht anders bezeichnet, in Kilo-Basenpaaren angegeben. Teil B zeigt die HindIII-Verdauung von DNA aus λ-Minipräparationen. Spur 1: λ RZ11; Spur 2: λWH473; Spur 3: λ RZ11; Spur 4: λ WH470; Spur 5: λWH471; Spur 6: λ WH472; Spur S: Längenstandard λ/HindIII. Die Länge der Fragmente ist in Kilo-Basenpaaren angegeben. Das 3,8 kbp-Fragment von λRZ11 wird durch die Rekombination auf 3,6 kbp verkürzt.

4.3.4.3 Expression und Regulation der tetA-lacZ Transkriptionsfusionen

Die λ-lysogenen Stämme wurden mit den Plasmiden pRT241 und pRT240 transformiert (Kap. 4.3.3.3), und die ß-Galaktosidaseaktivität der verschiedenen Stämme mit und ohne Repressor wurde bestimmt. Tab. 4.10 zeigt das Ergebnis der Messungen.

Tabelle 4.10: Regulation der Expression der tetA-lacZ Transkriptionsfusionen.

Zeile	E.coli Stamm	Mutante	Plasmid	β-Galakto-sidase Akt.	Standard-abweichung	% Akt.	Standard-abweichung
1	CSH26::λWH470	O_1O_2	---	116	2,5	100	2,2
2			pRT241	1,8	0,8	1,5	0,7
3			pRT240	0,02	0,01	0,02	0,01
4	CSH26::λWH471	$O_1{}^cO_2$	---	106	2,6	100	2,5
5			pRT241	5,2	1,9	3,2	1,2
6			pRT240	0,07	0,02	0,07	0,02
7	CSH26::λWH472	$O_1O_2{}^c$	---	253	5	100	2,0
8			pRT241	22,9	0,6	9,1	0,2
9			pRT240	0,19	0,02	0,07	0,007
10	CSH26::λWH473	$O_1{}^cO_2{}^c$	---	224	10,5	100	4,7
11			pRT241	202	14,6	90	6,5
12			pRT240	198	14,8	90	6,7

Die tetA-lacZ-Transkriptionsfusion wird durch Tet-Repressor in trans reprimiert (Zeile 1,2,3). Die $O_1{}^cO_2{}^c$-Doppelmutation wird durch Repressor in trans nicht beeinflußt (Zeile 10,11,12), d.h. es findet keine Bindung des Tet-Repressors an die mutierten Operatoren statt. Die Effekte bei den übrigen Fusionen gehen also auf die Bindung des Repressors an die Wildtyp-Operatoren zurück. Sowohl die Fusion mit der $O_1{}^cO_2$-Mutante als auch mit der $O_1O_2{}^c$-Mutante werden durch Tet-Repressor reprimiert (Zeile 4-9). Sowohl der Repressor-O_1 als auch der Repressor-O_2 Komplex allein regulieren die Expression des tetA-Gens. Das Ausmaß an Repression der Mutanten ist um den Faktor 2-6 geringer als in der Wildtyp-Situation, wobei O_2 stärker wirkt als O_1.

Der Unterschied in der Grundexpression der Wildtyp- und $O_1{}^cO_2$-Fusion einerseits und der $O_1O_2{}^c$- und $O_1{}^cO_2{}^c$-Fusion andererseits, der bei den Translationsfusionen auftrat, ist in diesem System bis auf einen Faktor 2 zurückgegangen (Zeile 1,4,7,10). Es handelt sich also primär um einen Effekt auf Translationsebene.

4.3.5 Simultane Expression von tetA und tetR

Um die Transkription der beiden Gene tetA und tetR und deren Regulation durch die einzelnen Repressor-Operator Komplexe simultan zu verfolgen, wurde die tet-Regulatorregion an zwei verschiedene, divergent angeordnete Indikatorgene fusioniert.

Zu diesem Zweck wurde der Vektor pCB302a verwendet, der mir freundlicherweise von K. Schneider, Freiburg, zur Verfügung gestellt wurde. pCB302a ist in Abb. 4.30 dargestellt.

Abb. 4.30: Der Vektor pCB302a. Die Sequenz des Polylinkers und des Beginns des ß-Galaktosidase-Leserasters ist vergrößert herausgezeichnet. Das Leseraster der ß-Galaktosidase ist durch die Aminosäuresequenz über der Nukleotidsequenz gekennzeichnet. Die drei Stopcodons vor Beginn des ß-Galaktosidase-Leserasters sind eingerahmt. to: λ to-Terminator.

Der Vektor trägt die beiden Gene lacZ und galK in umgekehrter Orientierung. Beide Gene besitzen keinen eigenen Promotor, jedoch eigene Translationsstartsignale. Zwischen den beiden Genen befindet sich ein Polylinker mit verschiedenen Restriktionsschnittstellen. Vor dem Startcodon der ß-Galaktosidase befinden sich drei Stopcodons in den drei verschiedenen Leserastern. Am Ende des galK-Gens wurde der λ to-Terminator insertiert, um zu verhindern, daß ein starker Promotor in Richtung auf galK mit dem Ursprung der Replikation interferiert. Der Vektor ist ca. 7,0 kb groß und trägt als Selektionsmarker das Gen für Ampicillinresistenz (Schneider und Beck, im Druck).

4.3.5.1 Konstruktion von bidirektionalen Transkriptionsfusionen in pCB302a

Die tet-Regulatorregionen wurden als 140 bp BamHI-Fragmente (Abb. 4.18) in die BamHI-Stelle von pCB302a insertiert. Je 25 µg der M13-Derivate mWH490, mWH491, mWH492 und mWH493 (siehe Kap. 4.3.3.1) wurden mit BamHI restringiert und die 140 bp langen BamHI-Fragmente wurden durch Elution aus einem 5%igen Polyacrylamidgel isoliert. 5 µg pCB302a wurden mit BamHI linearisiert. Je 1/3 der eluierten Fragmente wurden mit 0,1 µg linearisiertem pCB302a ligiert und auf E.coli CB454 transformiert. Die Transformationsansätze wurden auf LB-Platten mit Ampicillin und X-Gal (Kap. 3.4) ausplattiert. 20-30% der Transformanden waren ß-Galaktosidase-positiv. Jeweils acht blaue Kolonien wurden vereinzelt. Die DNA aus Schnellpräparationen wurde mit XbaI verdaut und auf einem 5%igen Acrylamidgel analysiert. Bei einer Insertion des 140 bp-Fragments in tetA-lacZ Orientierung muß dabei ein 146 bp langes XbaI-Fragment entstehen. Bei umgekehrter Orientierung entsteht ein 68 bp langes Fragment (Abb. 4.32). Alle analysierten Plasmide zeigten das 146 bp-Fragment (Abb. 4.31). Einige Plasmide trugen Mehrfachinsertionen, bei ihnen ist in Abb 4.31 unterhalb des 146 bp-Fragments noch das 140 bp-XbaI-Fragment zu erkennen. Offensichtlich besteht auch bei dieser Konstruktion ein Selektionsdruck gegen eine tetR-lacZ-Fusion, wie er schon in Kap. 4.3.4 beobachtet wurde.

Je ein rekombinantes Plasmid mit Einfachinsertion wurde präpariert. Abbildung 4.32 zeigt die Restriktionsanalyse. Durch Verdauung mit

BamHI wird das insertierte 140 bp-Fragment aus dem Vektor freigesetzt. Die XbaI-Verdauung zeigt nochmals die tetA-lacZ-Orientierung des Fragments durch das Auftreten des 146 bp-Fragments. Die HaeIII Verdauung zeigt, daß das 365 bp HaeIII-Fragment von pCB302a bei den konstruierten Plasmiden durch ein etwa 140 bp größeres Fragment ersetzt wird. Alle übrigen Fragmente sind identisch, was die Intaktheit des Vektors belegt.

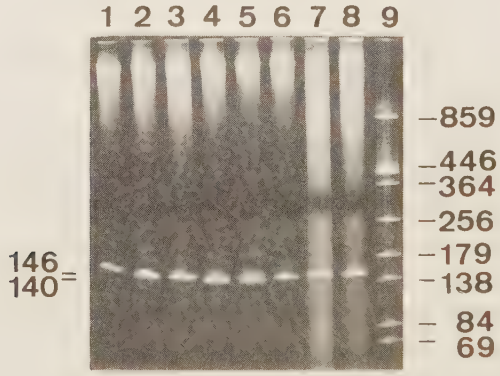
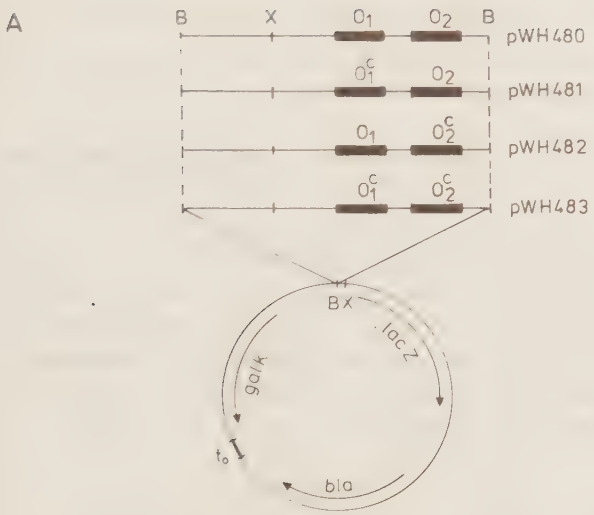


Abb. 4.31: XbaI-Verdauung der Plasmide aus Schnellpräparationen. Spur 1-8: Kandidaten der Transformation. Spur 9: Längenstandard pVH27/EcoRI/HindIII. Die Plasmide in Spur 2, 4 und 5 tragen eine Doppelinsertion.



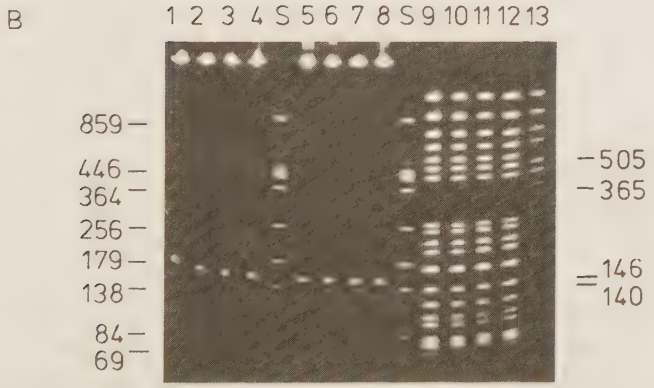


Abb. 4.32: Teil A zeigt die Konstruktion der Plasmide pWH480, pWH481, pWH482 und pWH483. B: BamHI; X: XbaI. to: λ to-Terminator. Teil B zeigt die Restriktionsanalyse der Plasmide. Spur 1-4: XbaI; Spur 5-8: BamHI; Spur 9-12: HaeIII; Spur 1, 5 und 9: pWH480; Spur 2, 6 und 10: pWH481; Spur 3, 7 und 11: pWH482; Spur 4, 8 und 12: pWH483; Spur 13: pCB302a/HaeIII; Spur S: Längenstandard pVH27/EcoRI/ HaeIII. Die Längen der Fragmente sind in Basenpaaren angegeben. Das 365 bp HaeIII-Fragment von pCB302a wird durch die Insertion auf 505 bp verlängert.

4.3.5.2 Expression und Regulation der tetA-lacZ und tetR-galK Fusionen

Zur Messung der Expression der tetA-lacZ und der tetR-galK Fusionen wurden die Plasmide pWH480, pWH481, pWH482 und pWH483 auf E.coli CB454 (galK$^-$, lacZ$^-$) transformiert. Zur Messung der Regulation der Expression durch Tet-Repressor wurden die Stämme E.coli CB454/pWH480-CB454/pWH483 mit den Plasmiden pRT240 bzw. pRT241 (siehe Kap. 4.3.3.3) transformiert. Die Anwesenheit der beiden Plasmide wurde durch Schnellpräparation und Analyse auf einem 1%igen Agarosegel nachgewiesen. Je drei Kolonien wurden für die Messungen eingesetzt. Die Zellen wurden wie in Kap. 3.10.2 beschrieben angezogen und aufgeschlossen. Beide Enzymaktivitäten wurden aus dem gleichen Zellysat gemessen. Die Messungen wurden 3-5 mal durchgeführt. Tabelle 4.11 zeigt die Expression der Fusionen im unreprimierten Zustand.

Tabelle 4.11: Expression der tetA-lacZ und der tetR-galK Fusionen der Plasmide pWH480, pWH481, pWH482 und pWH483.

E.coli Stamm	Mutante	tetR-galK		tetA-lacZ	
		Galaktokinase Aktivität	Stand. abw.	ß-Galaktosidase Aktivität	Stand. abw.
CB454/pWH480	O_1O_2	1419	180	1082	132
CB454/pWH481	$O_1{}^cO_2$	181	24	1065	118
CB454/pWH482	$O_1O_2{}^c$	1635	272	942	271
CB454/pWH483	$O_1{}^cO_2{}^c$	341	33	952	76

Die Aktivität der tetA-lacZ Fusion ist in allen vier Konstruktionen gleich. Die in Kap. 4.3.3 und Kap. 4.3.4 gezeigte Expressionserhöhung durch die Mutation des Operators O_2 ist also ein Translationseffekt. Die Aktivitäten der tetR-galK-Fusionen zeigen, daß die Mutation des Operators O_1 gleichzeitig die Stärke der tetR-Promotoren um den Faktor 6-8 reduziert.

Tabelle 4.12 zeigt die Regulation der Fusionen durch die beiden Repressor-exprimierenden Plasmide pRT241 und pRT240. Die Expression ist

in Prozent der unreprimierten Expression angegeben. Die Werte setzen sich aus 3-5 Messungen mit je 3 Proben zusammen.

Tabelle 4.12: Regulation der Expression der tetR-lacZ und der tetR-galK Fusionen der Plasmide pWH480, pWH481, pWH482 und pWH483.

Zeile	E.coli Stamm	Mutante	Repressor-plasmid	% Galakto-kin. Akt.	Stand. abw.	% B-Galakto-sid. Akt.	Stand. abw.
1	CB454/pWH480	O_1O_2	---	100	15,6	100	16,9
2			pRT241	75	6,5	38	4,5
3			pRT240	0,8	0,18	0,2	0,12
4	CB454/pWH481	$O_1{}^cO_2$	---	100	8,3	100	6,3
5			pRT241	74	8,0	31	6,7
6			pRT240	33	4,8	0,3	0,12
7	CB454/pWH482	$O_1O_2{}^c$	---	100	12,7	100	20,1
8			pRT241	56	6,7	33	8,4
9			pRT240	0,7	0,11	0,2	0,06
10	CB454/pWH483	$O_1{}^cO_2{}^c$	---	100	9,2	100	12,8
11			pRT241	97	9,6	100	13,4
12			pRT240	41	6,9	37	6,5

Die ß-Galaktosidaseaktivität spiegelt die Expression der tetA-lacZ-Fusionen wider. Durch die von pRT241 exprimierte Repressormenge wird die $O_1{}^cO_2{}^c$-Fusion nicht reprimiert (Zeile 11). Es findet also keine Bindung an die mutierten Operatoren statt. Die Expression von tetA wird sowohl durch den Repressor-O_1 Komplex als auch durch den Repressor-O_2 Komplex allein reguliert (Zeile 5,8). Die Repression des Wildtyps und der beiden Einzelmutanten auf nur 30-40% der Aktivität zeigt, daß die intrazelluläre Repressorkonzentration nicht hoch genug ist, um alle Wildtyp-Operatoren zu besetzen.

Durch die von pRT240 exprimierte Repressormenge wird auch die $O_1{}^cO_2{}^c$-Mutante reprimiert (Zeile 12). Die intrazellulären Repressor- und Operatorkonzentrationen sind in diesem System so hoch, daß es zu einer partiellen Bindung an die mutierten Operatoren kommt. Die Expression der $O_1{}^cO_2{}^c$-Fusion wird dadurch auf 40% reduziert. Die Repres-

sormenge ist andererseits groß genug, um durch Bindung an die WT-Operatoren die WT-Fusion und die $O_1{}^cO_2$- bzw. $O_1O_2{}^c$-Fusionen auf unter 1% der Aktivität zu reprimieren (Zeile 3,6,9). Die Wildtyp-Operatoren werden also quantitativ mit Repressor besetzt.

Die Galaktokinaseaktivität zeigt die Regulation der tetR-galK-Fusionen. Die Aktivität der $O_1{}^cO_2{}^c$-Mutante zeigt wiederum, daß es bei der von pRT241 exprimierten Repressormenge zu keiner Bindung an die mutierten Operatoren kommt (Zeile 11). Unter diesen Bedingungen werden sowohl die WT- als auch die beiden Einzelmutanten-Fusionen reprimiert. Die Repression ist bei der $O_1O_2{}^c$-Fusion am größten, die der $O_1{}^cO_2$-Fusion entspricht etwa der der WT-Fusion (Zeile 2,5,8).

Durch die von pRT240 exprimierte Repressormenge wird die WT-tetR-galK Fusion auf unter 1% reprimiert. Unter diesen Bedingungen wird die $O_1{}^cO_2{}^c$-Mutante auf ca 40% reprimiert, was der Bindung des Repressors an die mutierten Operatoren entspricht (Zeile 12). Die $O_1O_2{}^c$-Mutante wird wie der Wildtyp auf unter 1% reprimiert. Die Bindung des tet-Repressors an O_1 reguliert also die Expression von tetR. Die $O_1{}^cO_2$-Mutante dagegen wird nur auf 33% reprimiert. Bei Bindung des Repressor an O_2 wird die Transkription von tetR also nicht abgeschaltet. Die Repression dieser Mutante ist etwas größer, als es durch die Bindung von Repressor an die mutierten Operatoren zu erwarten wäre (vgl. Zeile 6,12). Die Bindung des Repressors an O_2 ist also nicht völlig ohne Einfluß auf die Transkription von tetR. Dies zeigt auch die Repression der $O_1{}^cO_2$-tetR-galK Fusion durch pRT241 (vgl. Zeile 5,11).

Die Expression des tetA-Gens wird also sowohl von einem einzelnen Repressor-O_2 Komplex als auch von von einem einzelnen Repressor-O_1 Komplex reprimiert. Die Expression des tetR-Gens wird von einem einzelnen Repressor-O_1 Komplex reprimiert. Bei der Bindung von Repressor nur an den Operator O_2 wird das tetR-Gen dagegen exprimiert.

5 DISKUSSION

Die Bindung des Tn10 Tet-Repressors an die beiden Operatoren O_1 und O_2 wurde sowohl quantitativ als auch hinsichtlich der Struktur der Repressor-Operator Komplexe untersucht. Die Affinitäten des Repressors zu den beiden Operatoren wurden *in vivo* durch Kompetition eines plasmidcodierten Operators mit den *tet*-Operatoren einer chromosomalen *tet-lacZ* Fusion um freien Repressor gemessen. Dabei wurde die Repressor-Operator Bindung indirekt über die ß-Galaktosidaseaktivität bestimmt. Die Linearität des Systems im verwendeten Meßbereich wurde durch die Messung der Dissoziationskonstanten der Komplexe *in vitro* überprüft. Die mit den beiden Meßmethoden gefundenen Affinitäten stimmen gut überein. Unter der Annahme, daß die Assoziationskonstanten der Komplexe gleich sind, spiegeln die Unterschiede in den Dissoziationskonstanten die Unterschiede in den Bindekonstanten wider. Diese entsprechen den Unterschieden der ß-Galaktosidaseaktivität des *in vivo* Systems. Die Bindekonstante des Repressor-O_2 Komplexes ist etwa doppelt so groß wie die des Repressor-O_1 Komplexes.

Der Einfluß des Basenpaares an Position 7 wurde untersucht. Die Einführung von Punktmutationen zeigte, daß dieses Basenpaar an der Bindung des Tet-Repressors beteiligt ist. Alle eingeführten Mutationen senken die Affinität des Repressors. Die stärkere Bindung an O_2 kommt also nicht durch eine größere Präferenz des Repressors für ein G:C Basenpaar an Position 7 zustande. In diesem Fall müßte die Bindung an die symmetrische Operatormutante OM1 noch stärker sein als an O_2. Sie ist dagegen um den Faktor zwei schwächer. Unter den untersuchten Sequenzvarianten bindet der natürliche Operator O_2 den Repressor am besten. Dies ist überraschend, da der Repressor als Proteindimer selbst symmetrisch ist, aber einen asymmetrischen Operator bevorzugt. Die Erklärung hierfür muß in einem zusätzlichen Einfluß der beiden weiteren Sequenzunterschiede zwischen O_1 und O_2 liegen. Systematische Basenpaaraustausche der Operatoren an allen drei unterschiedlichen Positionen sollten hier den Einfluß jedes einzelnen Basenpaares auf die Bindung klären können.

Die Struktur der verschiedenen Repressor-Operator Komplexe wurde durch DNaseI-Schutzexperimente untersucht. Dabei war die Hypothese aufgestellt worden, daß eine im geschützten Bereich des Operators O_2 gelegene DNaseI-hypersensitive Stelle eine strukturelle Besonderheit des Repressor-O_2 Komplexes widerspiegele. Bei der Reproduktion des Experiments mit dem 19 bp langen Operator O_2 in einer veränderten Sequenzumgebung trat keine hypersensitive Stelle auf. Vielmehr zeigte sich auf beiden DNA-Strängen eine von DNaseI spaltbare Stelle im geschützten Bereich, wie sie auch für den Repressor-O_1 Komplex beschrieben wurde (Schollmeier, 1985). Sie wies jedoch keinen signifikanten Intensitätsunterschied zwischen Plus- und Minusstrang auf. Die Hypersensitivität der Phosphodiesterbindung im ersten Experiment wird demnach nicht durch den Repressor-Operator Komplex begründet, sondern durch die Sequenzumgebung des Operators.

DNaseI zeigt eine ausgeprägte Spezifität für bestimmte Phosphodiesterbindungen der DNA, erkennbar durch das unregelmäßige Spaltungsmuster (vgl. Abb. 4.2). Neben der Sequenz kann auch die Biegung der DNA Einfluß auf das Spaltungsmuster der DNase haben. Es wurde gezeigt, daß auf einer gekrümmten DNA periodische hypersensitive Stellen im Abstand von einer Helixwindung auftauchen (Hochschild und Ptashne, 1986; Krämer et al., 1987). Derartige Variationen im Spaltungsmuster können die Interpretation der Feinstruktur von Protein-Nukleinsäure Komplexen erschweren. Hierfür sollte ein Reagenz geeigneter sein, das die DNA sequenz- und strukturunabhängig schneidet. Daneben ist es wegen der Größe der DNaseI schwierig, zugängliche Lücken innerhalb eines Protein-DNA Komplexes genau zu bestimmen.

Eine Alternative zur DNaseI besteht in der Verwendung eines chemischen Reagenz zur Spaltung der DNA. Als geeignet hierfür wurde die Reaktion von Hydroxylradikalen mit der DNA beschrieben (Tullius und Dombroski, 1986). Diese Reaktion ist basenunspezifisch, so daß eine gleichmäßige Leiter an DNA-Fragmenten bei der Gelelektrophorese entsteht. Außerdem kann die Struktur von Protein-DNA Komplexen durch die Kleinheit des Reagenz besser aufgelöst werden. So wurden bei der Untersuchung des λ Repressor-O_R1 Komplexes zwei geschützte Regionen mit einem zugänglichen Zwischenraum von 5-6 Nukleotiden anstatt eines großen geschützten Bereichs wie bei der DNaseI-Schutzreaktion gefunden

(Tullius und Dombroski, 1986; Hochschild et al., 1986). Durch Hydroxylradikal-Footprints könnte unter anderem die für DNaseI zugängliche Stelle zwischen dem vierten und fünften Basenpaar, die bei allen untersuchten Repressor-Operator Komplexen gefunden wurde, genauer charakterisiert werden.

Neben dem Einfluß einzelner Nukleotide der Operatorsequenz auf die Bindung des Tet-Repressors wurde auch der Einfluß des Abstands der beiden palindromischen Hälften zueinander untersucht. Aus G-Schutz Experimenten und der Untersuchung von Mutanten geht hervor, daß das zentrale Basenpaar keinen direkten Kontakt zum Repressor und keinen Einfluß auf dessen Bindung hat (Hillen, et al., 1984; Wissmann, pers. Mitteilung). Seine Deletion bzw. Verdopplung wirkt also nur über die Anordnung der beiden palindromischen Hälften zueinander auf die Repressorbindung. Die Affinität des Repressors zu dem verkürzten bzw. dem verlängerten Operator lag in dem verwendeten in vivo Titrationssystem im Bereich des Blindwertes. Die Bindung des Repressors ist demnach stark vom Abstand der beiden palindromischen Hälften bzw. deren Anordnung zueinander, die durch die Insertion oder Deletion eines Nukleotids um 36° verdreht wird, abhängig. Das Repressordimer ist also zu starr, um solche Veränderungen ausgleichen zu können. Dies gilt nicht nur für die Verkürzung des Abstands, bei der eventuell der verbleibende Raum auf der DNA zu klein sein könnte, sondern auch für seine Vergrößerung.

Im Gegensatz zu diesen Befunden ist bekannt, daß der Lac-Repressor an Operatormutanten, bei denen das zentrale Basenpaar deletiert wurde, achtmal besser als an den Wildtyp-Operator bindet (Simons et al., 1984). Der Lac-Repressor ist also bezüglich der DNA-Bindung flexibler als der Tet-Repressor. Der Lac-Repressor besitzt wie der λ-Repressor eine ausgeprägte Domänenstruktur (Jovin et al., 1977). Durch limitierte Proteaseverdauung konnte er in eine N-terminale Domäne, die für die DNA-Bindung und eine C-terminale Domäne, die für die Tetramerisierung zuständig ist, gespalten werden (Geisler und Weber, 1977). Eine solche ausgeprägte Domänenstruktur ist vom Tet-Repressor nicht bekannt. Versuche einer limitierten Proteasespaltung ergaben keinen Hinweis auf einen sensitiven Bereich zwischen zwei Domänen (Heuer, 1984). Ein

Strukturunterschied dieser Art könnte erklären, warum die Bindung an die beiden Operatorhälften beim Tet-Repressor starrer ist als beim Lac-Repressor. Um hierüber weitere Aussagen zu machen, müßte die Struktur des Tet-Repressors, z.B. durch Röntgenstrukturanalyse, aufgeklärt werden.

Durch die Insertion des T:A Basenpaars bei der Synthese des Operators O_1^{+1} wurde eine NdeI-Schnittstelle geschaffen, mit deren Hilfe die beiden Operatorhälften voneinander getrennt werden können. Dies eröffnet die Möglichkeit, durch eine Insertion definiert langer DNA-Fragmente zwischen die beiden Operatorhälften zu untersuchen, ob es ab einem gewissen Abstand wieder zu einer Bindung des Repressors an die beiden separierten Hälften kommt. Es ist bekannt, daß die gleichzeitige Bindung eines Lac-Repressor-Tetramers an zwei Operatoren über eine Distanz von 21 Helixwindungen zu einer Biegung der DNA führt (Krämer et al., 1987). Ob ein Repressor-Dimer in ähnlicher Weise an zwei getrennte Operatorhälften binden kann, könnte durch die Untersuchung derartiger Mutanten geklärt werden.

Im Anschluß an die Untersuchungen einzelner Operatorsequenzen bezüglich der Bindung des Tet-Repressors wurde der Einfluß der beiden Operatoren in der nativen tet-Kontrollregion charakterisiert. Hierzu wurde eine Punktmutation, von der bekannt war, daß sie die Repressorbindung drastisch reduziert (Wissmann et al., 1986), in jeweils einen der beiden Operatoren in der tet-Kontrollregion eingeführt. Die Bindung des Repressors an die mutierten Kontrollregionen wurde durch DNaseI-Schutzexperimente untersucht. Bei stöchiometrischen Konzentrationen bindet der Repressor selektiv an die unmutierten Operatoren. Die Bindekonstante der Komplexe aus Tet-Repressor und mutiertem Operator wurde zu 10^7-10^8 M^{-1} abgeschätzt. Sie ist damit um mindestens 2 Zehnerpotenzen niedriger als die des Wildtyp Repressor-Operator Komplexes (Kleinschmidt et al., im Druck).

Gleichzeitig wurde untersucht, ob aufgrund von kooperativen Effekten die Bindung des Repressors an einen mutierten Operator in Nachbarschaft zu einem Wildtyp-Repressor-Operator Komplex erleichtert wird. Aufgrund der Auflösungsgrenze des Experiments kann ein kooperativer Effekt ausgeschlossen werden, der größer als ein Faktor von ca. fünf

ist. In diesem Bereich liegt der abgeschätzte Fehler des Experiments, der sich aus den Fehlern der Bestimmung der Repressor- und der DNA-Konzentration zusammensetzt.

Die eingeführten Mutationen beeinflussen neben der Repressorbindung noch weitere Eigenschaften der tet-Kontrollregion. Die in den Operator O_2 eingeführten Mutationen erhöhen die Expression einer tetA-lacZ Translationsfusion um das 20fache. Da die Mutation im transkribierten Bereich von tetA liegt, kann es sich dabei entweder um einen Transkriptions- oder um einen Translationseffekt handeln.

Dies konnte durch Vergleich mit Transkriptionsfusionen geklärt werden. Zwei verschiedene tetA-lacZ Transkriptionsfusionen wurden konstruiert. Die ß-Galaktosidase-Expression durch die Phagen λ WH470-λ WH473 (Kap. 4.3.4) zeigt noch eine zweifache Erhöhung durch die O_2^c-Mutation, die Expression durch die Plasmide pWH480-pWH483 (Kap. 4.3.5) wird von der Mutation nicht beeinflußt. Im ersten Fall kommt es zu einer Fusion des tetA-Leserasters mit dem trpB-Leseraster (Abb. 5.1).

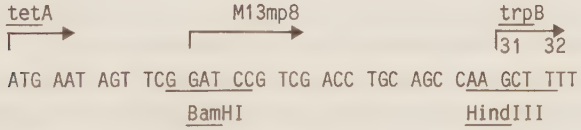


Abb. 5.1: Fusion des tetA-Leserasters an das trpB-Leseraster auf dem Plasmid pWH470 und dem Phagen λ WH470.

Dieses terminiert erst bei Aminosäure 15 der ß-Galaktosidase (vgl. Abb. 4.27). Für überlappende Translationen wurde beschrieben, daß die Effizienz der ersten Translation einen polaren Effekt auf die der zweiten ausübt (Oppenheim und Yanofsky, 1980; Aksoy et al., 1984). Dies könnte die Erhöhung der ß-Galaktosidase-Expression durch die O_2-Mutation erklären. Im zweiten Fall, der tetA-lacZ Fusion auf den Plasmiden pWH480-pWH483 (Kap. 4.3.5), liegen dagegen zwischen dem Stopcodon von tetA und dem Startcodon von lacZ 12 Nukleotide (Abb. 5.2). Durch diesen Abstand kommt es hier zu keiner Translationskopplung.

Die O^C_2 Mutation beeinflußt also die Translationseffizienz der vom tetA-Promotor ausgehenden mRNA. Dies kann entweder durch die Wechselwirkung mit einer ribosomalen RNA oder durch die Veränderung einer eventuellen Sekundärstruktur der mRNA geschehen. Eine signifikante Homologie zum 3'-Ende der 16 S-rRNA (Shine und Dalgarno, 1974) konnte für den entsprechenden Bereich nicht gefunden werden.

tetA
ATG AAT AGT TCG GAT CCG TCG ACC TGC AGG CGG
BamHI

AGA ACT GGT AGG TAT GGA AGA TCT CTA GAA GCT

stop lacZ
TCT AGC [TAG] AGGGTATTAATA ATG AAA GGG

Abb. 5.2: Die Termination des tetA-Leserasters in pWH480-483. Der Beginn des tetA- und des lacZ-Leserasters sind über der Sequenz markiert. Die tetA-Translation terminiert an dem eingerahmten Stopcodon.

Die Mutation des Operators O_1 beeinflußt neben der Bindung des Tet-Repressors auch die Expression der tetR-galK Fusion (Kap. 4.3.5). Die Mutation liegt nur in Bezug auf P_R1 im transkribierten Bereich (s. Abb. 2.5 und Abb. 4.17). Da der Anteil des Promotors P_R1 an der Transkription von tetR in vivo aber auf weniger als 5% geschätzt wird (Schollmeier, 1985), muß es sich um eine Mutation des Promotors P_R2 handeln. Die beiden Punktmutationen liegen außerhalb der -10 und -35 Konsensus-Sequenzen von P_R2. Es ist jedoch bekannt, daß auch Basenpaaraustausche in den benachbarten nichtkonservierten Bereichen die Promotorstärke beeinflussen (Lewin, 1985; McClure, 1985). Eine der beiden Punktmutationen befindet sich zwei Basenpaare in 5'-Richtung von der -10 Region von P_R2. Für diese Position wurden Promotormutanten beschrieben (von Hippel et al., 1984).

Die Regulation der Gene tetA und tetR durch die einzelnen Repressor-Operator Komplexe wurde in vivo durch die Verwendung verschiedener Gen- und Operonfusionen untersucht.

Zunächst wurde der Vektor mWH6 verwendet, der konstruiert worden war, um Genfusionen der tet-Gene an das lacZ' Gen von M13 zu ermöglichen. Zwischen die Stelle, in die die Promotoren insertiert werden sollten, und den Replikationsursprung von M13 wurde ein Fragment kloniert, das zwei Terminatorstrukturen trägt. Dies sollte sicherstellen, daß die Einführung der divergenten Promotoren nicht zur Instabilität des Vektors führt. Allerdings befinden sich auf diesem Fragment auch die -35 und -10 Konsensus-Sequenzen des Promotors für die RNAII des ColE1-Ursprungs (Selzer et al., 1983). Dessen Aktivität ist auf mWH6 nicht detektierbar, da die Translationsstartsignale für die ß-Galaktosidase deletiert wurden. Sie sollte sich nach Einführung der tet-Kontrollregion jedoch zur Aktivität der tet-Promotoren hinzuaddieren. Die gefundenen Expressionsunterschiede, die durch die Mutation des Operators O_2 hervorgerufen werden, sind von dieser konstanten, eventuellen Hintergrundtranskription unabhängig.

Große Mengen an Tet-Repressor, wie sie durch pRT240 exprimiert werden, reprimieren die Genfusionen auf unter 1% (s. Tab. 4.8). Die Aktivität des ColE1-Promotors ist also entweder nicht größer als dieser Wert, oder die Transkription von diesem Promotor aus wird durch die Tet-Operatoren, die sich 120 bis 150 Basenpaare in 3'-Richtung befinden, ebenfalls reprimiert. In beiden Fällen wird die Interpretation der Regulation des tetA-Promotors davon nicht beeinflußt. Die Daten zeigen, daß der tetA-Promotor sowohl durch die Besetzung von O_1 als auch durch die Besetzung von O_2 mit Repressor reguliert wird.

Die in diesem System konstruierte tetR-lacZ-Translationsfusion war nicht durch Repressor regulierbar. Durch die Fusion entsteht ein Protein, das die 16 N-terminalen Aminosäuren des Tet-Repressors trägt (s. Abb. 4.24). Zur Erklärung der fehlenden Regulation kann diskutiert werden, daß das gebildete tetR-lacZ Fusionsprotein durch die N-terminalen Aminosäuren des Repressors mit dem intakten Tet-Repressor wechselwirkt und diesen dadurch inaktiviert. Um den Einfluß des Repressor-Anteils an dem gebildeten Fusionsprotein zu untersuchen, müßte dieser so deletiert werden, daß nur noch das ATG des tetR-Lese-

rasters als Startcodon für die Translation der ß-Galaktosidase in der Fusion verbleibt. Da in der vorliegenden Arbeit primär eine funktionale tetR-Fusion von Interesse war, wurden keine weiteren Untersuchungen an dieser tetR-lacZ Translationsfusion vorgenommen.

Bei der Konstruktion von Transkriptionsfusionen der divergenten tet-Promotoren an das lacZ-Gen wurde in zwei verschiedenen Konstruktionen unter ca. 40 Kandidaten immer nur die tetA-lacZ Orientierung erhalten. Die tetR-lacZ Orientierung konnte auf dem Plasmid pWH407 (Kap. 4.3.4) auch nicht durch eine gerichtete Klonierung erzwungen werden. pWH407 (s. Abb. 4.27) trägt den fd-Terminator (Gentz et al., 1981) zwischen dem ß-Galaktosidase-Gen und dem Replikationsursprung. Es ist nicht bekannt, ob sich auch zwischen dem ß-Laktamase-Gen und dem Replikationsursprung ein Terminationssignal befindet. Andernfalls könnte die Transkription in dieser Richtung durch einen starken Promotor zu einer Instabilität des Plasmids führen (Stüber und Bujard, 1982; Adams und Hatfield, 1984; Lambert und Reznikoff, 1985). Der tetA Promotor ist um den Faktor 2-4 stärker als die beiden tetR Promotoren (Bertrand et al., 1984; Schneider und Beck, 1986). Dieser Unterschied könnte dazu führen, daß nur tetA-lacZ Fusionen auf pWH407 stabil sind.

Bei der Klonierung der tet-Kontrollregion in den Vektor pCB302a (Kap. 4.3.5) wurde ebenfalls nur die tetA-lacZ Orientierung erhalten. Auch eine gerichtete Klonierung mit dem Ziel, eine tetA-galK Fusion zu konstruieren, war auf diesem Vektor nicht möglich (Schneider, K., pers. Mitteilung). pCB302a trägt im Anschluß an das Galaktokinase-Gen den λto-Terminator (Schneider und Beck, im Druck). Eine starke Transkription der tetA-galK Fusion sollte also nicht mit der Replikation des Plasmids interferieren. Die tetA-galK Fusion konnte auf pCB302a konstruiert werden, nachdem das lacZ Gen deletiert worden war (Schneider, K., pers. Mitteilung). Dies spricht dafür, daß eine Selektion gegen die Konstruktion einer tetR-lacZ Fusion besteht. Möglicherweise ist dies auch die Ursache für die Instabilität der tetR-lacZ Fusion auf pWH407. Das Problem wurde durch die Fusion der tetR Promotoren an das Galaktokinase-Gen gelöst. Die tetR-galK Fusion erwies sich als stabil und konnte für die Messung der Regulation der tetR Promotoren eingesetzt werden.

Für die Messung der Regulation des tetA Promotors standen zwei verschiedene Transkriptionsfusionen zur Verfügung, eine chromosomale sowie eine plasmidcodierte tetA-lacZ Fusion. Beide Systeme zeigen, daß tetA sowohl durch Repressor an O_1 als auch an O_2 reguliert wird. Die Expressionsdaten stimmen weitgehend überein (Tab. 4.10 und Tab. 4.12). Dies zeigt, daß das plasmidäre System keine größeren Fehler aufgrund von Kopienzahlschwankungen aufweist.

Die Messungen mit den chromosomalen Fusionen (Tab. 4.10) zeigen, daß der Wildtyp bei niedrigen Repressorkonzentrationen stärker reprimiert wird als die $O_1{}^cO_2$- und $O_1O_2{}^c$-Mutanten. Dieser Effekt wurde bei den Messungen mit den plasmidcodierten Fusionen nicht beobachtet (Tab. 4.12). Der Unterschied ist dadurch zu erklären, daß es sich im letzteren Fall um ein Multikopiensystem handelt, bei dem der Repressor im Verhältnis zu den Operatoren im Unterschuß vorliegt. Im Falle des Wildtyps können pro Plasmid zwei Repressoren gebunden werden, im Falle der Mutanten dagegen nur ein Repressor. Dadurch können bei gleicher Repressormenge insgesamt mehr Mutanten-Fusionen reprimiert werden. Die Repression des Wildtyps erscheint dadurch geringer, als es den realen Verhältnissen entspricht.

Die chromosomale Fusion zeigt weiterhin, daß der Operator O_2 einen größeren Einfluß auf die Repression von tetA hat als O_1. Dieser Unterschied, der durch die größere Affinität des Repressors zu O_2 erklärbar ist, wurde auch bei den chromosomalen Translationsfusionen gefunden (Tab. 4.8). Die plasmidcodierten Fusionen zeigen dagegen keinen Unterschied zwischen O_1 und O_2. Eventuell ist der Effekt zu klein, um bei der größeren Streuung in einem Multikopiensystem meßbar zu sei.

Durch die Verwendung des Vektors pCB302a konnten die divergierenden tet-Promotoren an zwei verschiedene Indikatorgene fusioniert werden. Dadurch konnte der Einfluß der einzelnen Repressor-Operator Komplexe auf beide Transkriptionsrichtungen gleichzeitig verfolgt werden.

Die Bindung des Tet-Repressors an den Operator O_1 blockiert sowohl die Transkription von tetA als auch die von tetR. Die Sequenz zeigt, daß der Operator O_1 mit allen drei Bindestellen für die RNA-Polymerase überlappt (s. Abb. 4.17). Er überlappt nicht mit der -10 und -35 Konsensusregion von P_R1, doch sollte, da die Ausdehnung der an einen Pro-

motor gebundenen RNA-Polymerase bis zu Nukleotid +20 reicht (von Hippel et al., 1984), auch hier eine direkte räumliche Hinderung erfolgen. Die Bindung des Repressors an O_2 reprimiert ebenfalls die von P_A ausgehende Transkription. Auch hier überlappen die Bereiche auf der DNA, die der Repressor und die an P_A gebundene Polymerase beanspruchen. Dagegen kann bei einem an O_2 gebundenen Repressor eine Transkription in Richtung auf tetR erfolgen. Eine gleichzeitige Besetzung durch Tet-Repressor an O_2 und Polymerase muß also möglich sein. Da der Promotor P_R1 vollständig mit O_2 überlappt, kommt als Bindestelle für die RNA-Polymerase dabei nur P_R2 in Betracht. Die Ergebnisse in Tab. 4.12 deuten an, daß es eine schwache Repression der Expression von tetR durch den Repressor-O_2 Komplex gibt. Dies könnnte auf das Ausfallen von P_R1 zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse der Arbeit ermöglichen einen Vergleich der regulatorischen Elemente der tet-Gene mit denen der ebenfalls divergent angeordneten und gemeinsam regulierten Gene cI und cro von λ. Der Tet-Repressor hat eine etwa doppelt so hohe Affinität für den Operator O_2 wie für O_1. Dieser Unterschied ist geringer als der Affinitätsunterschied des CI Repressors für die Operatoren O_R1 und O_R3, der etwa 15 beträgt. Dieser größere Affinitätsunterschied beruht ebenfalls nur auf drei unterschiedlichen Positionen in der Sequenz der Operatoren (Hochschild et al., 1986). Es wurde gezeigt, daß das G:C Basenpaar an Position 7 des tet-Operators O_2 die Affinität des Repressors nicht erhöht sondern verringert. Die drei Basenpaaraustausche, die O_2 und O_1 unterscheiden, wirken also offenbar sowohl verstärkend als auch abschwächend auf die Repressorbindung, so daß die Summe der Effekte nur zu einem geringen Affinitätsunterschied führt.

Kooperativität zwischen den einzelnen Repressor-Operator Komplexen bewirkt bei λ, daß O_R2 trotz eines Affinitätsunterschieds bei der gleichen Repressorkonzentration besetzt wird wie O_R1. Zwischen den beiden tet Repressor-Operator Komplexen scheint keine Kooperativität zu bestehen. Die DNaseI-Schutzexperimente zeigten, daß die Bindung des Tet-Repressors an einen mutierten Operator nicht durch die Nachbarschaft eines Repressor-Operator Komplexes begünstigt wird. Vergleichbare Experimente mit λ -Operatoren zeigten, daß die Bindung an einen

mutierten Operator bei 10fach niedrigerer Repressorkonzentration erfolgt, wenn er sich in Nachbarschaft zu einem Wildtyp-Operator befindet (Hochschild und Ptashne, 1986).

Die beiden Gene cI und cro werden durch die drei Repressor-Operator Komplexe differentiell reguliert. Während durch die kooperative Besetzung von O_R1 und O_R2 cro abgeschaltet wird, reguliert der an O_R2 gebundene Repressor die Transkription von cI positiv. Erst bei höherer Repressorkonzentration wird auch O_R3 besetzt und cI abgeschaltet. Einen Hinweis auf positive Regulation gibt es bei der Regulation der tet-Gene nicht. Wie bei λ führt aber auch hier die Besetzung desjenigen Operators, zu dem der Repressor eine höhere Affinität hat, zu einer differentiellen Regulation der beiden Gene. Das Gen für die Tetrazyklinresistenz wird bereits durch die Besetzung von O_2 reprimiert, während die Expression des Tet-Repressors solange weiter erfolgt, bis beide Operatoren besetzt sind.

Die beiden zusätzlichen Elemente der Regulation am rechten Operator von λ , Kooperativität und positive Regulation, lassen sich durch die unterschiedlichen Ansprüche an die beiden Systeme verstehen. Der CI-Repressor reguliert seine eigene Synthese sowohl positiv als auch negativ. Wird er entfernt, wie es bei der SOS-Reaktion der Zelle durch das RecA-Protein geschieht, so wird aufgrund der fehlenden positiven Regulation kaum cI nachgebildet. Dies ist sinnvoll, da das System nun nicht mehr in seinen alten Zustand, die Aufrechterhaltung der Lysogenie, zurückfallen soll. Der Tet-Repressor reguliert seine eigene Synthese nur negativ. Wird der Repressor durch Tetrazyklin inaktiviert, führt dies zur Synthese neuen Tet-Repressors. Sinkt die Tetrazyklinkonzentration in der Zelle wieder, so wird durch Bindung des Repressors an die Operatoren der alte Zustand wieder hergestellt.

Das zweite zusätzliche regulatorische Element bei λ , die Kooperativität der beiden an O_R1 und O_R2 gebundenen Repressoren, führt dazu, daß die Repression des cro-Gens gegen Schwankungen in der Repressorkonzentration "gepuffert" ist (Ptashne, 1986). Erst wenn die Konzentration an CI drastisch sinkt, wird das cro-Gen exprimiert und die lytische Entwicklung eingeleitet. Dieser Effekt stabilisiert den Phagen im lysogenen Zustand gegen zufällige Schwankungen in der Repressorkonzentration. Die Expression des tetA-Gens soll dagegen rasch er-

folgen, sobald Tetrazyklin in die Zelle eindringt. Schwankungen in der Repressorkonzentration können hier dadurch ausgeglichen werden, daß zuerst O_1 frei wird, und durch die Expression von tetR Repressor nachgeliefert wird, während die Expression von tetA noch reprimiert bleibt.

Die für eine differentielle Regulation mehrerer Gene durch ein DNA-Bindeprotein geforderten Effekte - unterschiedliche Affinität des Proteins zu verschiedenen Bindestellen und unterschiedliche Auswirkung der Bindung auf die regulierten Gene - konnten für die Regulation der tet-Gene durch den Tet-Repressor gezeigt werden.

Das in Abb. 2.5 dargestellte Regulationsmodell kann nun erweitert werden. In Abwesenheit von Tetrazyklin sind beide Operatoren mit Repressor besetzt und die Gene tetA und tetR sind abgeschaltet. Sinkt die intrazelluläre Repressorkonzentration, wird zuerst O_1 frei. In diesem Zustand bleibt das tetA-Gen reprimiert, das tetR-Gen wird exprimiert. Dadurch ist das System gegen geringe Schwankungen in der Repressorkonzentration gepuffert. Im Falle der Induktion durch Tetrazyklin sinkt die Affinität des Repressors zu den beiden Operatoren drastisch. Beide Gene werden exprimiert. Sinkt die intrazelluläre Konzentration an Tetrazyklin durch die Aktivität des tetA-Proteins, entsteht wieder freier Repressor. Sowohl das tetA-Gen als auch, bei ausreichend hoher Repressorkonzentration, das tetR-Gen werden reprimiert.

6 LITERATUR

Adams, C.W. und Hatfield G.W. (1984). Effects of promoter strengths and growth conditions on copy number of transcription-fusion vectors. J. Biol. Chem. 259, 7399-7403.

Aksoy, S., Squires, C.L. und Squires, C. (1984). Translational Coupling of the trpB and trpA Genes in the E.coli Tryptophan Operon. J. Bacteriol. 157, 363-367.

Alberts B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M, Roberts, K. und Watson, J.D. (1983). Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc., New York.

Anderson, W.F., Ohlendorf, D.H., Yakeda, Y. und Matthews, B.W. (1981). Structure of the cro repressor from bacteriophage λ and its interaction with DNA. Nature 290, 754-758.

Bertrand, K.P., Postle, K., Wray, L.V., Jr. und Reznikoff, W.S. (1983). Overlapping divergent promoters control expression of the Tn10 tetracycline resistance. Gene 23, 149-156.

Bertrand, K.P., Postle, K., Wray, L.V., Jr. und Reznikoff, W.S. (1984). Construction of a Single-Copy Promoter Vektor and Its Use in Analysis of Regulation of the Transposon Tn10 Tetracycline Resistance Determinant. J. Bacteriol. 158, 910-919.

Bolivar, F., Rodriguez, R.L., Greene, P.J., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, J.H. und Falkow, S. (1977). Construction and characterisation of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. Gene 2, 95-133.

de Crombrugghe, B., Busby, S. und Buc, H. (1984). Cyclic AMP Receptor Protein: Role in Transcription Activation. Science 224, 831-838.

Galas, D.J. und Schmitz, A. (1978). DNase footprinting: A simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. Nucleic Acids Res. 5, 3157-3170.

Geisler, N. und Weber, K. (1977). Isolation of the Amino-Terminal Fragment of Lactose Represssor Necessary for DNA Binding. Biochemistry 16, 938-943.

Gentz, R., Langner, A., Chang, A.C.Y., Cohen, S.N. und Bujard, H. (1981). Cloning and analysis of strong promoters is made possible by the downstream placement of a RNA termination signal. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4936-4940.

Gilbert, W. und Maxam, A. (1973). The Nucleotide Sequence of the Lac Operator. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3581-3584.

Gilbert, W. und Müller-Hill, B. (1966). Isolation of the Lac Repressor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 1891-1898.

Gilbert, W. und Müller.Hill, B. (1967). The Lac Operator is DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58, 2415-2421.

Gottesmann, S. (1981). Genetic Control of the SOS System in E. coli. Cell 23, 1-2.

Guha, A., Saturen, Y. und Szybalski, W. (1971). Divergent orientation of transcription from the biotin locus of Escherichia coli. J. Mol. Biol. 56, 53-62.

Hardies, S.C., Patient, R.K., Klein, R.D., Ho, F., Reznikoff, W.S. und Wells, R.D. (1979). Construction and mapping of recombinant plasmids used for the preparation of DNA fragments containing the E. coli lactose operator and promotor, J. Biol. Chem. 254, 5527-5534.

Heuer, Ch., Diplomarbeit, Darmstadt, 1984.

Hillen, W., Klock, G., Kaffenberger, I., Wray, L.V., Jr. und Reznikoff, W.S. (1982). Purification of Tet Repressor and Tet Operator from the Transposon Tn10 and Characterisation of their Interaction. J. Biol. Chem. 257, 6605-6613.

Hillen, W., Gatz, Ch., Altschmied, L., Schollmeier, K. und Meier, I. (1983). Control of Expression of Tn10-encoded Tetracycline Resistance Genes. I. Equilibrium and Kinetic Investigations of the Regulatory Reactions. J. Mol. Biol. 169, 707-721.

Hillen, W. und Schollmeier, K. (1983). Nucleotide sequence of the Tn10 encoded tetracycline resistance gene. Nucleic Acids Res. 11, 525-539

Hillen, W., Schollmeier, K. und Gatz, Ch. (1984). Control of Expression of the Tn10-encoded Tetracycline Resistance Operon. II. Interaction of RNA-Polymerase and Tet Repressor with the tet-Operon Regulatory Region. J. Mol. Biol. 72, 185-201.

von Hippel, P.H., Bear, D.G., Morgan, W.D. und McSwiggen, J.A. (1984). Protein-Nucleic Acid Interactions in Transcription: A Molecular Analysis. Ann. Rev. Biochem. 53, 389-446.

Hochschild, A., Douhan III, J. und Ptashne, M. (1981). How Repressor and Cro Distinguish between O_R1 and O_R3. Cell 47, 807-816.

Hochschild, A. und Ptashne, M. (1986). Cooperative Binding of Repressors to Sites Separated by Integral Turns of the DNA Helix. Cell 44, 681-687.

Ippen, K., Shapiro, J.A. und Beckwith, J.R. (1971). Transposition of the lac Region to the gal Region of the E.coli Chromosome: Isolation of lac Transducing Bacteriophages. J. Bacteriol. 108, 5-9.

Johnson, A., Meyer, B.J. und Ptashne, M. (1978). Mechanism of action of the cro protein of bacteriophage . Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1783-1787.

Johnson, A.D., Meyer, B.J. und Ptashne, M. (1979). Interactions between DNA-bound repressors govern regulation by λ phage repressor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 5061-5065.

Johnson, A.D., Poteete, A.R., Laner, G., Sauer, R.T., Ackers, G.K und Ptashne, M. (1981). λ Repressor and cro - components of an efficient molecular switch. Nature 294, 217-223.

Jorgensen, R.A. und Reznikoff, W.S. (1979). Organisation of structural and regulatory genes, that mediate tetracycline resistance in transposon Tn10. J. Bacteriol. 138, 705-714.

Jovin, Th.M., Geisler, N. und Weber, K. (1977). Amino-terminal fragments of E.coli lac repressor bind to DNA. Nature 296, 668-672.

Kleinschmidt, Ch., Tovar, K., Hillen, W. und Pörschke, D.. Dynamic of a Repressor-Operator Recognition: The Tn10-encoded Tetracycline Resistance Control. Biochemistry, im Druck.

Klock, G., Unger, B., Gatz, Ch, Hillen W., Altenbuchner, J., Schmid, K. und Schmitt, R. (1985). Heterologous Repressor-Operator Recognition Among Four Classes of Tetracycline Resistance Determinants. J. Bacteriol. 161, 326-332.

Krämer, H., Niemöller, M., Amouyal, M., Revet, B., von Wilcken-Bergmann, B und Müller-Hill, B. (1987). Lac-Repressor forms loops with linear DNA carrying two suitably spaced lac operators. EMBO J. 6, 1481-1491.

Kramer, W., Drutsa, V., Jansen, H.W., Kramer, B., Pflugfelder, M. und Fritz, H.-J. (1984). The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456.

Kreuzaler, F., Ragg, A., Fautz, E., Kuhn, D.N. und Hahlbrock, K. (1983). UV-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of Petroselinum hortense. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2591-2593.

Kuhnke, G., Krause, A., Heilbach, C., Gieske, U., Fritz, H.-J. und Ehring, R. (1986). The upstream operator of the E. coli galactose operon is sufficient for repression of transcription initiated at the cyclic AMP-stimulated promoter. EMBO J. 5, 167-173.

Lambert, P.F. und Reznikoff, W.S. (1985). Use of transcriptional repressors to stabilize plasmid copy number of transcriptional fusion vectors. J. Bacteriol. 162, 441-444.

Levy, S.B. und McMurry, L. (1974). Detection of an inducible membrane protein associated with R factor mediated tetracycline resistance. Biochem. Biophys. Res. Commun. 56, 1060-1068.

Levy, S.B. und McMurry, L. (1978). Plasmid determined tetracycline resistance involves new transport system for tetracycline. Nature 276, 90-92.

Lewin, B.M. (1974). Gene Expression: Volume 1. Bacterial Genomes. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Lewin, B.M. (1985). Genes II. John Wiley & Sons, Inc. New York.

Maniatis, T., Fritsch, E.F., und Sambrock, J. (1982). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Maurer, R., Meyer, B. J. und Ptashne, M. (1980). Gene Regulation of the Right Operator (O_R) of Bacteriophage λ . I. O_R3 and Autogenous Negative Control by Repressor. J. Mol. Biol. 139, 147-161.

Maxam. A. und Gilbert, W. (1980). Sequencing endlabelled DNA with base-specific chemical deavages. Methods Enzymol. 65, 499-580.

McClure, W.R. (1985). Mechanisms and control of Transcription Initiation in Procaryotes. Ann. Rev. Biochem. 54, 171-204.

McKay, D.B. und Steitz, T.A. (1981). Structure of catabolite gene activator protein at 2,9 Å resolution suggests binding to left-handed B-DNA. Nature 290, 744-749.

McMurry, L., Petrucci, R.E und Levy, S.B. (1980). Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3974-3977.

Messing, J. (1983). New M13 Vectors for Cloning. Methods Enzymol. 101, 20-78.

Messing, J., Gronenborn, B., Müller-Hill, B. und Hofschneider, P.H. (1977). Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: Insertion of a HindIII fragment of the lac regulatory region in M13 replicative form in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 3642-3646.

Meyer, B.J., Maurer, R. und Ptashne, M. (1980). Gene Regulation at the Right Operator (O_R) of Bacteriophage λ. II. O_R1, O_R2 and O_R3: Their Roles in Mediating the Effects of Repressor and Cro. J. Mol. Biol. 139, 163-194.

Meyer, B.J. und Ptashne, M. (1980). Gene Regulation at the Right Operator (O_R) of Bacteriophage λ. III. Repressor Directly Acivates Gene Transcription. J. Mol. Biol. 139, 195-205.

Miller, J.H. (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Miller, J.H. und Reznikoff, W.S., eds. (1978) The Operon. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.

Munson, L.M., Ph. D. thesis, University of Wisconsin, Madison, USA, 1983.

Munson, L.M., Stormo, G.D., Niece, R.L. und Reznikoff, W.S. (1984). LacZ Translation Initiation Mutations. J. Mol. Biol. 177, 663-683.

Oehmichen, R., Klock, G., Altschmied, L. und Hillen, W. (1984). Construction of an E. coli strain overproducing the Tn10-encoded Tet repressor and its use for large scale purification. EMBO J. 3, 539-543.

Ohlendorf, D.H., Anderson, W.F., Fisher, R.G., Taheda, Y. und Matthews, B.W. (1982). The molecular basis of DNA-protein recognition inferred from the structure of cro repressor. Nature 298, 718-723.

Ohmori, H. und Tomizawa, J. (1979). Nucleotide Sequence of the Region Required for Mainenance of Colicin E1 Plasmid. Molec. Gen. Genet. 176, 161-170.

Oppenheim, D.S. und Yanofsky, Ch. (1980). Translational coupling during expression of the Tryptophan operon of Escherichia coli. Genetics 95, 785-795.

Pabo, C.O. und Lewis, M. (1982). The operator-binding domain of λ repressor: Structure and DNA recognition. Nature 298, 443-447.

Pabo, C.O. und Sauer, R.T. (1984) Protein-DNA Recognition. Ann. Rev. Biochem. 53, 293-322.

Piette, J., Cumin, R., Boyen, A., Charlier, D., Crabeel, M., van Vliet, F., Glansdorff, N., Squires, C. und Squires, C.L. (1982). The regulatory region of the divergent arg ECBH operon in Escherichia coli K12. Nucleic Acids Res. 10, 8031-8048.

Postle, K., Nguyen, T.T und Bertrand, K.P. (1984). Nucleotide sequence of the repressor gene of the Tn10 tetracycline resistance determinant. Nucleic Acids Res. 12, 4849-4863.

Pouwels, P.H., Enger-Walk, B.E. und Brammar, W.J. (1985). Cloning Vectors. A Laboratory Manual. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

Ptashne, M., Jeffrey, A., Johnson, A.D., Maurer, R., Meyer, B.J., Pabo, C.O., Roberts, T.M. und Sauer, R.T. (1980). How the λ Repressor and Cro work. Cell. 19, 1-11.

Ptashne, M. (1986). A Genetic Switch. Gene Control and Phage λ. Cell Press & Blackwell Scientific Publications.

Roberts, J.W., Roberts, C.W. und Craig, N.L. (1978). E. coli recA gene product inactivates phage repressor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4714-4718.

Rose, J.K. und Yanofsky, Ch. (1974). Interaction of the Operator of the Tryptophan Operon with Repressor, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3134-3138.

Rüther, U. (1982). pUR250 allows rapid chemical sequencing of both DNA strands of its insert. Nucleic Acids Res. 10, 5765-5772.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5463-5467.

Schneider, K. und Beck, Ch. F. (1986). Promoter-probe vectors for the analysis of divergently arranged promoters. Gene, 42, 37-48.

Schneider, K. und Beck, Ch.F.. New expression vectors for identifying and testing signal structures for initiation and termination of transcription. Methods Enzymol., im Druck.

Schollmeier, K. Dissertation, Universität Düsseldorf, 1985.

Selzer, G., Som, T., Itoh, T. und Tomizawa, J. (1983). The Origin of Replication of Plasmid p15A and Comparative Studies on the Nucleotide Sequences around the Origin of Related Plasmids. Cell. 32, 119-129.

Shine, J. und Dalgarno, L. (1974). The 3'-Terminal Sequence of Escherichia Coli 16S Ribosomal RNA: Complementary to Nonsense Triplets and Ribosome Binding Sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1342-1346.

Shine, J. und Dalgarno, L. (1975). Determinants of cistron specificity in bacterial ribosomes. Nature 254, 34-38.

Simons, A., Tils, D., von Wilcken-Bergmann, B. und Müller-Hill, B. (1984). Possible ideal lac operator: Escherichia coli lac operator-like sequences from eucaryotic genoms lack the central G:C pair. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1624-1628.

Squires, C.L., Lee, F.D. und Yanofsky, Ch. (1975). Interaction of the trp Repressor and RNA Polymerase with the trp Operon. J. Mol. Biol. 92, 93-111.

Struhl, K. (1987). Promoters, Activator Proteins and the Mechanism of Transcriptional Initiation in Yeast. Cell 49, 295-297.

Stüber, D. und Bujard. H. (1982). Transcription from efficient promoters can interfere with plasmid replication and diminish expression of plasmid specified genes. EMBO J. 1, 1399-1404.

Sutcliff, J.G. (1978). pBR322 restriction map derived from the DNA sequence: Accurate DNA size markers up to 4361 nucleotide pairs long. Nucleic Acids Res. 5, 2721-2728.

Takahashi, M., Altschmied, L. und Hillen, W. (1986). Kinetic and Equilibrium Characterisation of the Tet Repressor-Tetracycline Complex by Fluoreszenz Measurements. J. Mol. Biol. 187, 341-348.

Tullius, T.D. und Dombroski, B.A. (1986). Hydroxyl radical "footprinting": High-resolution information about DNA-protein contacts and application to λ repressor and cro protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5469-5473.

Winnacker, E.-L. und Dörper, T. (1982). In: Chemical and enzymatic synthesis of gene fragments. Gassen, H.G. und Lang, A., Herausgeber, S. 97-102, Verlag Chemie, Weinheim.

Wissmann, A., Diplomarbeit, TH Darmstadt, 1985.

Wissmann A., Meier, I., Wray, L.V., Jr., Geißendörfer, M. und Hillen, W. (1986). Tn10 tet operator mutations affecting Tet repressor recognition. Nucleic Acids Res. 10, 4253-4266.

Wray, L.V., Jr., Jorgensen, R.A. und Reznikoff, W.S. (1981). Identification of the Tetracycline Resistance Promoter and Repressor in Transposon Tn10. J. Bacteriol. 147, 297-304.

Wray, L.V., Jr. und Reznikoff, W.S. (1983). Identification of Repressor Binding Sites Controlling Expression of Tetracycline Resistance Endoded by Tn10. J. Bacteriol. 156, 1188-1191.

Yagle, M.K. und Palmiter, R.D. (1985). Coordinate Regulation of Mouse Metallothionein I and II Genes by Heavy Metals and Glucocorticoids. Mol. Cell. Biol. 5, 291-294.

Yamamoto, K.R. (1985). Steroid Receptor Regulated Transcription of Specific Genes and Gene Networks. Ann. Rev. Genet. 19, 209-252.

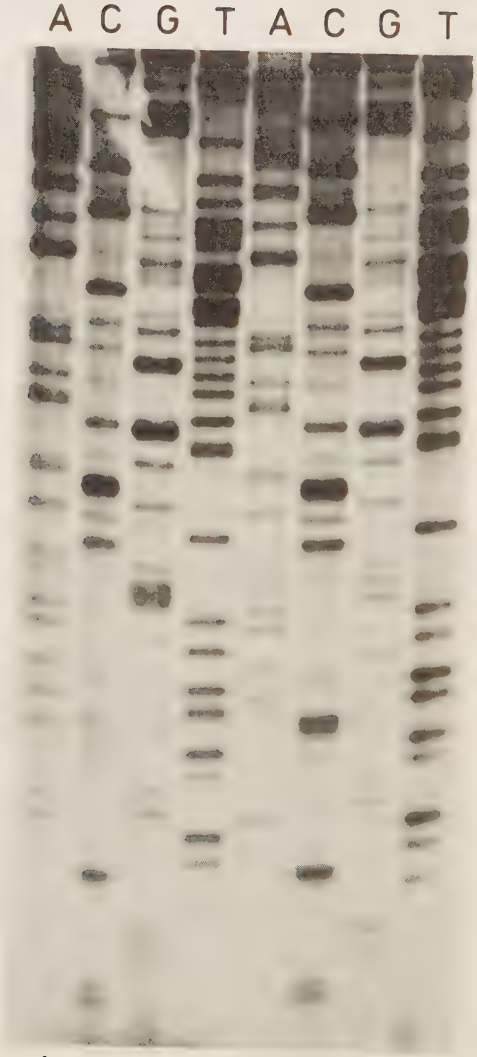
Yang, H.-L., Zubay, G. und Levy, S.B. (1976). Synthesis of an R-plasmid protein assoziated with tetracycline resistance is negatively regulated. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1509-1512.

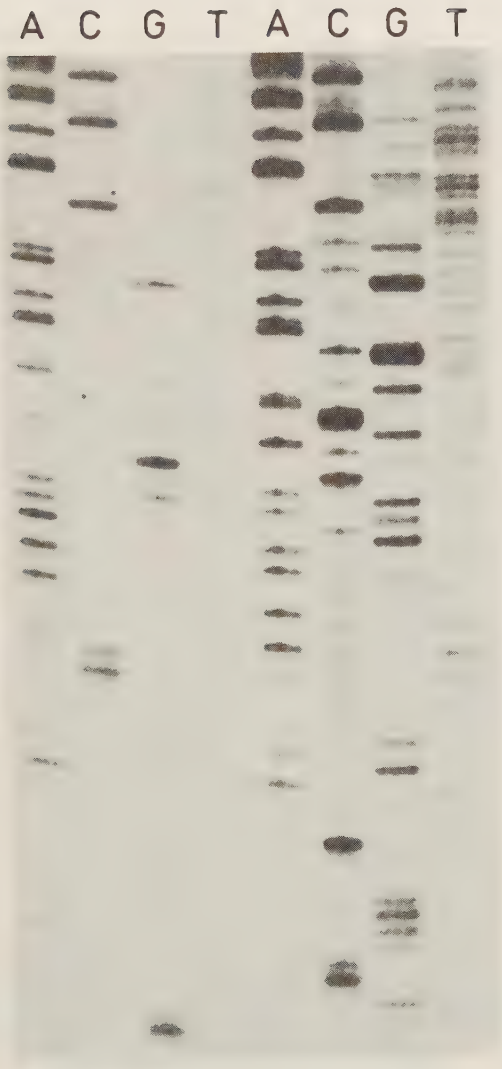
Yanofsky, C., Platt, T., Crawford, J.P., Nichols, B.P., Christie, G.E., Horowitz, H., van Cleemput, M. und Wu, A.M. (1981). The complete nucleotide sequence of the tryptophan operon of Escherichia coli Nucleic Acids Res. 9, 6647-6668.

Yu, Y.-M., Munson, L.M. und Reznikoff, W.S. (1984). Molecular Cloning and Sequence Analysis of trp-lac Fusion Deletions. J. Mol. Biol. 172, 355-362.

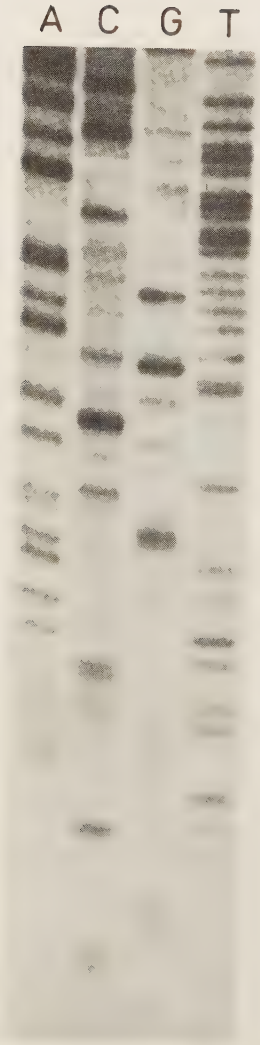
Yu, X.-M. und Reznikoff, W.S. (1984). Deletion analysis of the CAP-cAMP binding site of the E. coli lactose promoter. Nucleic Acids Res. 12, 5449-5464.

ANHANG 1



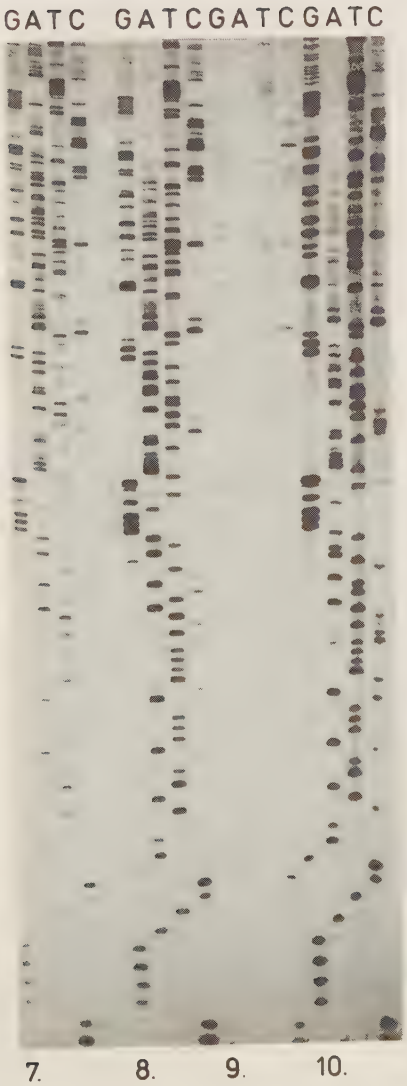


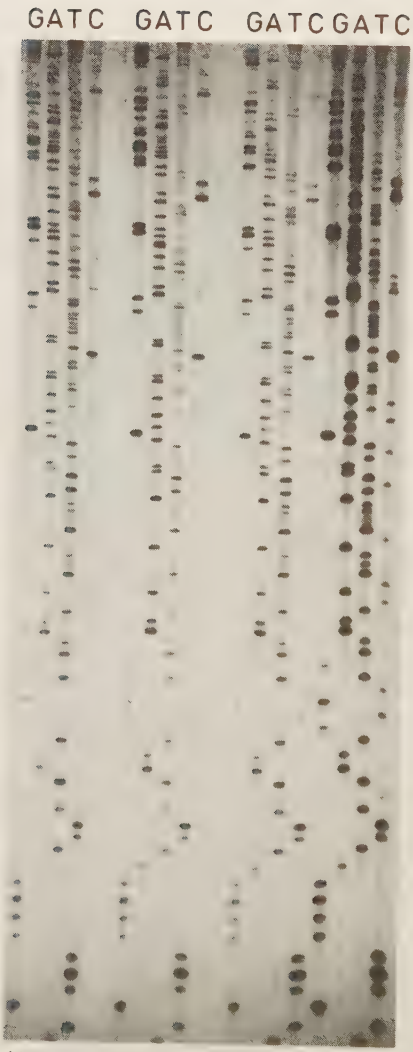
3. 4.



5.

6.


GATC GATCGATCGATC
7.
8.
9.
10.


GATC
GATC
GATC
GATC
11.
12.
13.
14.

Anhang 1: Autoradiographien der Sequenzierungen

1.: mWH453, Kapitel 4.1.2
2.: mWH450, Kapitel 4.1.2
3.: mWH454, Kapitel 4.2.2
4.: mWH452, Kapitel 4.1.2
5.: mWH451, Kapitel 4.1.2
6.: mWH455, Kapitel 4.2.2
7.: mWH480, Kapitel 4.3.3.1
8.: mWH481, Kapitel 4.3.3.1
9.: mWH482, Kapitel 4.3.3.1
10.: mWH483, Kapitel 4.3.3.1
11.: mWH490, Kapitel 4.3.3.1
12.: mWH491, Kapitel 4.3.3.1
13.: mWH492, Kapitel 4.3.3.1
14.: mWH493, Kapitel 4.3.3.1

LEBENSLAUF

Name:	Iris M e i e r
Geburtsdatum:	21.02.1959
Geburtsort:	Offenbach
Eltern:	Otto Meier; Anita Meier, geb. Eysen
Familienstand:	ledig

Schulausbildung:

1966 - 1971	Grundschule in Heusenstamm
1971 - 1978	Adolf-Reichwein-Gymnasium Heusenstamm
Mai 1978	Abitur

Studium:

1978 - 1984	Studium der Biologie an der Technischen Hochschule Darmstadt
April 1983	Diplomprüfung
Mai 1983 - März 1984	Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Hochschule Darmstadt
März 1984	Beginn der Promotion am Institut für Organische Chemie und Biochemie der Technischen Hochschule Darmstadt
September 1984	Wechsel mit Prof. Dr. W. Hillen an das Institut für Physikalische Biologie, Universität Düsseldorf

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Düsseldorf, den 30. Juli 1987

J. Klein